

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 528**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2005** **E 05733956 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014** **EP 1732945**

54 Título: **Métodos y composiciones para modular la contractilidad cardiaca**

30 Prioridad:

08.04.2004 US 560529 P
25.05.2004 US 574039 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.01.2015

73 Titular/es:

SANGAMO BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
POINT RICHMOND TECH CENTER, SUITE A100,
501 CANAL BOULEVARD
RICHMOND, CA 94804, US

72 Inventor/es:

ZHANG, H. STEVEN y
ZHANG, LEI

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 527 528 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y composiciones para modular la contractilidad cardiaca

5 **Antecedentes**

La insuficiencia cardiaca afecta a más de dos millones de estadounidenses, y la insuficiencia cardíaca congestiva se reconoce como la causa más común de hospitalización y mortalidad en la sociedad occidental. La insuficiencia cardíaca congestiva es un síndrome caracterizado por la disfunción ventricular izquierda, tolerancia al ejercicio reducida, deterioro de la calidad de vida y la esperanza de vida acortada dramáticamente. Disminución de la contractilidad del ventrículo izquierdo conduce a la reducción del gasto cardiaco con la consiguiente arterial sistémica y la vasoconstricción venosa.

La contractilidad parece estar regulada principalmente por el flujo de calcio. Para que el corazón se contraiga, el calcio debe ser liberado en el cuerpo principal (sarcoplasma) de las células cardíacas. Cuanto más calcio entra, más fuerte es la fuerza de contracción. Cuando el corazón se relaja, el calcio se bombea hacia fuera del sarcoplasma en el retículo sarcoplásmico (SR). Por lo tanto, el músculo cardíaco se activa para contraerse y relajarse por un mecanismo donde el calcio (Ca^{2+}) se libera desde un depósito en la célula muscular, o miocito, y luego se bombea rápidamente de vuelta al depósito, llamado retículo sarcoplásmico (SR) por la Ca^{2+} -ATPasa 2a del retículo sarco(endo)plásmico (SERCA2a).

La eficiencia con la que Ca^{2+} se devuelve al SR determina la cantidad de Ca^{2+} que está disponible para la siguiente contracción. El fosfolamban (PLN) es una fosfoproteína de regulación que modula el transporte activo de Ca^{2+} por el cardiaca reticular sarcoplásmico Ca^{2+} -ATPasa de la enzima (SERCA2) en el lumen del retículo sarcoplásmico. El fosfolamban, que es un inhibidor reversible de SERCA2, reprime la actividad de la enzima, y esta inhibición se alivia después de la fosforilación de PLN en respuesta a la estimulación β -adrenérgica.

La relación de fosfolamban a SERCA2 parece ser crítica en la regulación de la contractilidad miocárdica, y las alteraciones en esta relación pueden contribuir al deterioro funcional observada durante la insuficiencia cardíaca. (.. Koss et al (1997) básico Res Cardiol 1997; 92 Suppl 1: 17-24). En particular, una relación de SERCA2a / PLN disminuido, lo que se observa comúnmente en la insuficiencia cardíaca, conduce a la reducción SR Ca^{2+} reserva y se debilitó la contractilidad. La importancia de la SERCA2a: PLN relación a la contractilidad también ha sido examinado utilizando ratones defectivos en PLN; modelos murinos con insuficiencia cardiaca (por ejemplo, los modelos que sobreexpresan SERCA2a, así como en los cardiomiocitos humanos aislados (por ejemplo, la inhibición mediada por antisentido PLN en los miocitos que sobreexpresan SERCA2a). Véase, por ejemplo, MacLennan et al. (2003) Nat Rev Mol Cell Biol. 4 (7): 566-77; Eizema et al (2000) Circulación 101 (18): 2193-9; del Monte et al (2002) Circulación 105 (8): 904-7; Minamisawa et al (1999) Cell 99 (3): 313-22.

Sin embargo, la modulación de la expresión de PLN para modular la contractilidad cardiaca no se ha descrito previamente. Además, la capacidad de alterar la contractilidad cardiaca mediante la modulación de la expresión PLN puede tener utilidad en el tratamiento y / o prevención. insuficiencia cardíaca congestiva y / o otras enfermedades cardíacas.

Zhang et al. (Molecular Therapy Volume 9, Supplement 1, May 2004) divulga que las proteínas dedo de cinc pueden estar dirigidas al promotor humano o de rata de fosfolamban. No se ha divulgado una secuencia diana específica de tales proteínas dedo de cinc. Federica del Monte (Circulation 2002; 105:904-907) divulga células miocárdicas que fueron infectadas con adenovirus que codifican una molécula antisentido de fosfolamban. El documento WO 02/057293 divulga la modulación de la expresión génica por proteínas de dedos de cinc no canónicas.

El documento US 2003/0050259 A1 divulga ácidos nucleicos enzimáticos para la modulación de la expresión de dianas moleculares.

Jamieson et al. (Nature Reviews, Drug Discovery, Volume 2, p. 361-368, May 2003) analizan las proteínas dedo de cinc como plataforma tecnológica en el descubrimiento de medicamentos y terapéuticas.

Resumen

Una variedad de proteínas con dedos de cinc (ZFP) y métodos que utilizan tales proteínas se proporcionan para su uso en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca. En particular, se describen ZFP que se unen a un sitio diana en un gen fosfolamban (PLN). Las ZFP pueden fusionarse con un dominio regulador como parte de una proteína de fusión. Al seleccionar ya sea un dominio de activación o un dominio de represión para la fusión con la ZFP, se puede activar o reprimir la expresión de genes. Por lo tanto, mediante la elección apropiada del dominio regulador fusionado a la ZFP, se puede modular selectivamente la expresión de PLN, y por lo tanto controlar varios procesos fisiológicos correlacionados con la contractilidad y calcio compartimentación.

Mediante ingeniería de los ZFP que se unen a (y modular la expresión de) a PLN diversos grados, el grado en que un proceso fisiológico (por ejemplo, la contractilidad) es modulada se puede variar, permitiendo de este modo de tratamiento para ser adaptado. Esto se puede lograr debido a múltiples sitios diana (por ejemplo, sitios de 9, 12 o 18

pares de bases diana) en el gen PLN, o de hecho en cualquier gen implicado en la contractilidad o calcio compartimentación, puede ser adoptada por las ZFP proporcionados en el presente documento. Así, en algunos métodos, se administra una pluralidad de ZFP (o fusiones que comprenden estos ZFP). Estos ZFP pueden entonces unirse a diferentes sitios de destino situados en o alrededor del gen PLN. Tales ZFP pueden en algunos casos tener un efecto sinérgico. En ciertos métodos, la pluralidad de proteínas de fusión incluye diferentes dominios reguladores.

También se proporcionan en el presente documento polinucleótidos y ácidos nucleicos que codifican las ZFP divulgadas en el presente documento. Además, también se proporcionan composiciones farmacéuticas que contienen los ácidos y / o ZFP nucleicos. Por ejemplo, ciertas composiciones incluyen un ácido nucleico que codifica una de las ZFP descritos en el presente documento unido operativamente a una secuencia reguladora, en combinación con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, donde la secuencia reguladora permite la expresión del ácido nucleico en una célula. Composiciones a base de proteínas incluyen una ZFP como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable o diluyente.

Estas y otras realizaciones se les ocurrirán fácilmente a los expertos en la técnica en vista de la presente descripción.

La presente invención se describe en las reivindicaciones 1-10.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1, los paneles A y B, muestran las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión que comprenden ZFP ejemplares como se describe en el presente documento que reprimen la expresión de PLN. FIG. 1 A muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión que comprende la ZFP designado SBS-6439 (SEC ID N° 68). FIG. 1B muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión que comprende la ZFP SBS-6576 designado (SEC ID N° 69).

FIG. 2, los paneles AC, son gráficos que representan la represión de fosfolamban (PLN) expresión en células de rata transfectadas con vectores plasmídicos o de AAV que contienen una ZFP específica PLN. FIG. 2A muestra la represión del PLN por plásmidos que codifican proteínas de fusión que comprenden un dominio de represión KOX y ZFP orientada PLN (SBS-6435, SBS-6437 o SBS-6439). Las proteínas de fusión se designan 6435-KOX, SBS-6437-KOX o 6439-KOX. FIG. 2B muestra la represión de PLN por plásmidos que codifican 6439-KOX en las células no seleccionadas y las células sometidas a la selección de puomicina. FIG. 2C representa la represión de rata cuando PLN 6439-KOX se administra usando vectores plásmidos o AAV.

FIG. 3, paneles AD, son gráficos que representan la represión de fosfolamban (PLN) la expresión en células humanas transfectadas con plásmidos que contienen una ZFP específica PLN. FIG. 3 A representa represión de la expresión en las células PLN UtSMC por 6576-KOX en comparación con un control plásmido vacío. FIG. 3B representa represión de la expresión en las células PLN JRH30 por 6576-KOX en comparación con un control plásmido vacío. FIG. 3C representa represión de la expresión en las células PLN UtSMC por 6576-KOX y 6624-KOX en comparación con un control plásmido vacío. FIG. 3D representa represión de la expresión en las células PLN SJRH30 por 6576-KOX y 6624-KOX en comparación con un control plásmido vacío.

FIG. 4 es un gráfico que representa el efecto de las ZFP dirigidas a PLN sobre el tránsito de Ca^{2+} en cardiomiocitos de ratas adultas.

FIG. 5, los grupos A y B, representan represión PLN en cardiomiocitos de rata utilizando ZFP dirigida PLN. Figura 5 A muestra un gráfico de amplificación Taqman de PLN ARNm de cardiomiocitos de rata (RCM) y (2-1) células H9c2. El valor Ct para RCM PLN es -16 y el valor Ct para H9c2 (2-1) PLN es -22. Cada diferencia ciclo Ct representa una diferencia de 2 veces en el nivel de ARN. La Figura 5B muestra los niveles de mana PLN en cardiomiocitos de ratas infectadas con adenovirus. Los adenovirus que expresan bien 6439-Kox o el dominio de represión Kox solo se utilizaron para infectar los cardiomiocitos en la MOI indicada (100, 200 y 400).

La Figura 6 muestra los niveles de ARNm de fosfolamban (normalizados a 18S orna) en las células infectadas con AAV UtSMC que codifica la 1563 -KOX proteína represora fosfolamban (barra de la derecha). Como control (barra izquierda), otro cultivo de células UtSMC estaban infectados con AAV que codifica la proteína KOX-5475, una proteína represora dirigida al gen CHK2.

Descripción detallada

La materia objeto de la presente invención es un dominio de unión al ADN del dedo de cinc, donde el dominio de unión a ADN comprende seis dedos de cinc y la secuencia de aminoácidos de las regiones de reconocimiento de los dedos de cinc se selecciona del grupo que consiste en:

- F1: RSDHLSQ (SEQ ID NO:38)
- F2: RSDVRKN (SEQ ID NO:39)
- F3: RSDALSV (SEQ ID NO:40)
- F4: DNANRTK (SEQ ID NO:41)
- F5: RSDHLST (SEQ ID NO:42)
- F6: TSSNRTK (SEQ ID NO:43)

o

F1: RSDNLSE (SEQ ID NO:44)

F2: HSRSRKT (SEQ ID NO:45)

F3: DSESLNA (SEQ ID NO:46)

5 F4: TSSNLSR (SEQ ID NO:47)

F5: RSDNLSQ (SEQ ID NO:48)

F6: QRQHRKT (SEQ ID NO:49).

10 Otro aspecto de la invención es un polinucleótido que codifica una proteína que comprende un dominio de unión a ADN de dedo de cinc diseñado como se describe en el presente documento. Otro aspecto de la invención es una proteína que comprende un dominio de unión a ADN de dedo de cinc diseñado como se describe en el presente documento.

15 Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que reprime la transcripción de un gen de fosfolamban, donde el polipéptido comprende:

(i) un dominio de unión a ADN de dedo de cinc que está diseñado para unirse a un sitio diana en el gen fosfolamban; y
 20 (ii) un dominio de represión de la transcripción; donde el ácido nucleico puede expresarse en una o más células de un sujeto a tratar, donde el dominio de unión a ADN comprende seis dedos de cinc y la secuencia de aminoácidos de las regiones de reconocimiento de los dedos de cinc es tal como se describe en el presente documento.

25 Otro aspecto de la invención es una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se describe en el presente documento.

La práctica de los métodos, así como la preparación y el uso de las composiciones descritas en el presente documento emplean, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular, bioquímica, la estructura y el análisis de la cromatina, la química computacional, cultivo celular, ADN recombinante y campos relacionados como son dentro de la experiencia de la técnica. Estas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, , Sambrook et al. MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 y Tercera edición, 2001; Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 y actualizaciones periódicas; la serie METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego; Wolffe, CHROMATIN structure and function, Tercera edición, Academic Press, San Diego, 1998; METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999; y METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999.

40 L. DEFINICIONES

El término "proteína de dedo de cinc" o "ZFP" se refiere a una proteína que tiene dominios de unión a ADN que se estabilizan por el cinc. Los dominios de unión al ADN individuo se conoce normalmente como "dedos". Una ZFP tiene menos un dedo, típicamente dos, tres, cuatro, cinco, seis o más dedos. Cada dedo se une de dos a cuatro pares de bases de DNA, típicamente tres o cuatro pares de bases de ADN. Una ZFP se une a una secuencia de ácido nucleico denominada un sitio diana o segmento diana. Cada dedo comprende típicamente un subdominio de unión a ADN quelante de cinc de aproximadamente 30 aminoácidos. Un motivo de ejemplo que caracteriza una clase de estas proteínas (clase C2H2) es -Cys- (X) 2-4-Cys (X) 12-His- (X) 3-5-His (donde X es cualquier aminoácido) (SEC ID N° 1). Las clases adicionales de proteínas de dedos de cinc se conocen y son útiles en la práctica de los métodos, y en la fabricación y el uso de las composiciones descritas en el presente documento (véase, por ejemplo, Rhodes et al (1993) Scientific American 268: 56-65 y US Publicación de Solicitud de Patente N° 2003/0108880). Los estudios han demostrado que un solo dedo de cinc de esta clase consiste en una hélice alfa que contiene los dos residuos histidina invariantes coordinados con cinc junto con los dos residuos de cisteína de una sola vuelta beta (véase, por ejemplo, Berg y Shi, Science 271: 1081- 1085 (1996)).

Un "sitio diana" es la secuencia de ácido nucleico reconocida por una ZFP. Un solo sitio diana tiene típicamente alrededor de cuatro a aproximadamente diez pares de bases. Típicamente, una ZFP de dos dedos reconoce un sitio diana par seis y cincuenta y seis base, una ZFP de tres dedos reconoce un sitio diana de seis a diez par base, una ZFP de cuatro dedos reconoce una secuencia diana de 12-14 pb y un seis Dedos ZFP reconoce una secuencia diana de 18-20 pb, que puede comprender dos adyacentes de nueve a diez sitios diana de pares de bases o tres sitios diana 6-7 pb adyacentes.

A "subsitio diana" o "subsitio" es la porción de un sitio diana de ADN que está sujeta por un solo dedo de cinc, con exclusión de interacciones de hebra cruzada. Por lo tanto, en ausencia de interacciones de hebra cruzada, un subsitio es generalmente de tres nucleótidos de longitud. En los casos en que se produce una interacción cruzada cadena (es decir, una "subsitio D-able", consulte el co-propiedad WO 00/42219) un subsitio es cuatro nucleótidos de

longitud y se solapa con otro subsitio de 3 o 4 nucleótidos.

"Kd" se refiere a la constante de disociación para una molécula de unión, es decir, la concentración de un compuesto (por ejemplo, una proteína de dedos de cinc) que da media la unión del compuesto a su diana máxima (es decir, la mitad de las moléculas del compuesto se une a la diana) en condiciones dadas (es decir, cuando [diana] «Kd»), tal como se mide utilizando un sistema de ensayo dado (véase, por ejemplo, US Pat. No. 5,789,538). El sistema de ensayo utilizado para medir la Kd debe ser elegido de manera que da la medida más exacta de la Kd real de la ZFP. Cualquier sistema de ensayo se puede utilizar, siempre se da una medición exacta de la Kd real de la ZFP. En una realización, la Kd para una ZFP se mide usando un ensayo de cambio de movilidad electroforética ("EMSA"). A menos que se realice un ajuste de la pureza o actividad ZFP, los cálculos de Kd pueden dar lugar a una sobreestimación de la verdadera Kd de una ZFP dado. Preferiblemente, la Kd de una ZFP utilizada para modular la transcripción de un gen es menor que aproximadamente 100 nM, más preferiblemente menos de aproximadamente 75 nM, más preferiblemente menos de aproximadamente 50 nM, más preferiblemente menos de aproximadamente 25 nM.

Un "gen" para los fines de la presente descripción, incluye una región de ADN que codifica un producto génico, así como todas las regiones de ADN que regulan la producción del producto del gen, sea o no tales secuencias reguladoras son adyacentes a la codificación y / o secuencias transcritas. Por consiguiente, un gen incluye, pero no se limita necesariamente a, secuencias promotoras, terminadores, secuencias reguladoras traduccionales tales como sitios de unión al ribosoma y sitios internos de entrada al ribosoma, potenciadores, silenciadores, aisladores, los elementos de borde, orígenes de replicación, sitios de unión a la matriz y el control de locus regiones. Fosfolamban(PLN) secuencias de diversas especies se han descrito y publicado. Por ejemplo, las regiones promotor proximal del PLN humana (GenBank No. de acceso AF 177763), PLN rata (GenBank No. de acceso AH002227), pollo PLN (GenBank No. de acceso AH003051), cerdo PLN (GenBank No. de acceso XI 5075), PLN conejo (GenBank No. de acceso AH001235), ratón PLN perro PLN (AF037348) genes (GenBank nº de acceso NM_023129) y están disponibles.

Además, el término "gen" incluye ácidos nucleicos que son sustancialmente idénticos a un gen nativo. Los términos "identidad", "idéntico" o porcentaje en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos de aminoácidos que son los mismos, cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia, según se mide usando un algoritmo de comparación de secuencias tal como los descritos a continuación por ejemplo, o mediante inspección visual.

La frase "sustancialmente idénticos", en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que tienen al menos 75%, preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, 95% o superior, o cualquier identidad valor integral de nucleótidos entre los mismos o el residuo de aminoácido, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, tal como se mide utilizando un algoritmo de comparación de secuencias tal como los descritos a continuación por ejemplo, o mediante inspección visual. Preferiblemente, la identidad sustancial existe sobre una región de las secuencias que es al menos aproximadamente 10, preferiblemente aproximadamente 20, más preferiblemente alrededor de 40-60 restos de longitud o cualquier valor intermedio integral, preferiblemente sobre una región más de 60-80 residuos, más preferiblemente al menos aproximadamente 90-100 residuos, y lo más preferiblemente las secuencias son sustancialmente idénticas en la longitud completa de las secuencias que se comparan, tales como la región de codificación de una secuencia de nucleótidos, por ejemplo.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, a la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y los parámetros de programa de algoritmo de secuencia se designan. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces la identidad de secuencia por ciento para la secuencia de prueba (s) con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados.

La alineación óptima de secuencias para comparación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), por la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), O mediante inspección visual [véase, en general, Current Protocols in Molecular Biology, (Ausubel, FM et al., eds.) John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1987-1999, incluyendo suplementos como suplemento 46 (abril de 1999)]. El uso de estos programas para llevar a cabo comparaciones de secuencias se llevan a cabo típicamente usando los parámetros por defecto específicos para cada programa.

Otro ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990) El

software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Biotecnología . Información Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencia de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la consulta secuencia, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. Esto se refiere como el umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul et al., ant.). Estas coincidencias de palabras adyacentes iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Las coincidencias palabras después se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como la puntuación de alineamiento acumulativa puede ser aumentada. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, una matriz de puntuación se utiliza para calcular la puntuación acumulativa. Extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineamiento acumulativa disminuye en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más de puntuación negativa alineaciones de residuos; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Para la determinación de la similitud de secuencia los parámetros por defecto de los programas BLAST son adecuados. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62. El programa TBLASTN (usando secuencia de la proteína para la secuencia de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10, y una matriz de puntuación BLOSUM 62, (ver Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89: 10915 (1989)). 11171 Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, Proc Nat'l Acad Sci EE.UU. 90: 5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma (P (N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la menor probabilidad de suma en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, más preferiblemente menos de aproximadamente 0,01, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 0,001.

Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas hibridan entre sí en condiciones rigurosas. "hibrida sustancialmente" se refiere a la hibridación complementaria entre un ácido nucleico sonda y un ácido nucleico diana y abarca desapareamientos menores que pueden acomodarse mediante la reducción de la rigurosidad de los medios de hibridación para lograr la detección deseada de la secuencia de polinucleótido diana. La frase "hibridar específicamente con", se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula sólo a una secuencia de nucleótidos particular en condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, celular total) de ADN o ARN.

Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo en forma cruzada con el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico, como se describe a continuación.

"Variaciones modificadas de forma conservadora" de una secuencia de polinucleótidos concreta se refiere a aquellos polinucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el polinucleótido no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier polipéptido dado. Por ejemplo, los codones CGU, CGC, CGA, CGG, AGA y AGG codifican todos el aminoácido arginina. Por lo tanto, en cada posición donde una arginina es especificada por un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de "variaciones modificadas de manera conservadora." Cada secuencia de polinucleótido descrito en la presente memoria que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa, excepto donde se indique lo contrario. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica mediante técnicas estándar. Por consiguiente, cada "variación silenciosa" de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

Un polipéptido es típicamente sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo en sustituciones conservativas. Una "sustitución conservadora", cuando se describe una proteína, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos de la proteína que no altera sustancialmente la actividad de la proteína. Por lo tanto, "variaciones modificadas de manera conservadora" de una secuencia de aminoácidos particular, se refiere a sustituciones de aminoácidos de aquellos aminoácidos que no son críticos para la actividad de la proteína o la sustitución de aminoácidos con otros aminoácidos que tienen propiedades similares (por ejemplo, ácido, básico, positiva o cargado negativamente, polar o no polar, etc.) de tal manera que las sustituciones de aminoácidos incluso críticos no alteran sustancialmente la actividad. Las tablas de sustitución conservativa que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Creighton (1984) Proteins, WH Freeman and Company. Además, las sustituciones individuales,

supresiones o adiciones que alteran, añadir o eliminar un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en una secuencia codificada son también "variaciones modificadas de forma conservadora."

Un "fragmento funcional" o "equivalente funcional" de una proteína, polipéptido o ácido nucleico es una proteína, polipéptido o ácido nucleico cuya secuencia no es idéntica a la proteína de longitud completa, polipéptido o ácido nucleico, sin embargo, conserva la misma función que la proteína de longitud completa, polipéptido o ácido nucleico. Un fragmento funcional puede poseer más, menos, o el mismo número de residuos como la molécula nativa correspondiente, y / o puede contener una o más sustituciones de aminoácidos o nucleótidos. Los métodos para determinar la función de un ácido nucleico (por ejemplo, la función, la capacidad para hibridar con otro ácido nucleico, la unión a una molécula reguladora de codificación) son bien conocidos en la técnica. Del mismo modo, los métodos para determinar la función de la proteína son bien conocidos. Por ejemplo, la función de unión al ADN de un polipéptido se puede determinar, por ejemplo, mediante la unión de filtro, la movilidad electroforética de cambio, o ensayos de inmunoprecipitación. Ver Ausubel et al., ant.. La capacidad de una proteína para interactuar con otra proteína se puede determinar, por ejemplo, por co-inmunoprecipitación, ensayos de dos híbridos o complementación, tanto genéticos como bioquímicos. Véase, por ejemplo, Fields et al. (1989) Nature 340: 245-246; Patente de Estados Unidos. No. 5.585.245 y PCT WO 98/44350.

Los términos "ácido nucleico", "polinucleótido" y "oligonucleótido" se utilizan indistintamente y se refieren a un polímero de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma mono- o bicatenaria. Para los fines de la presente descripción, estos términos no deben interpretarse como limitantes con respecto a la longitud de un polímero. Los términos pueden abarcar análogos conocidos de nucleótidos naturales, así como los nucleótidos que están modificados en la base, azúcar y / o restos fosfato. En general, un análogo de un nucleótido particular tiene la misma especificidad de emparejamiento de bases; es decir, un análogo de una base de par voluntad con T. Por lo tanto, la secuencia de polinucleótido plazo es la representación alfabética de una molécula de polinucleótido. Esta representación alfabética puede ser introducida en bases de datos en un ordenador que tiene una unidad de procesamiento central y utilizarse para aplicaciones bioinformáticas tales como la genómica funcional y la búsqueda de homología. Los términos abarcan, además, ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos o residuos o enlaces del esqueleto modificados, que son sintéticos, de origen natural y de origen no natural, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de una manera similar a la los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos-2-O-metilo, y ácidos nucleicos peptídicos (PNAS). Las secuencias de nucleótidos se muestran en el presente documento en la "orientación convencional 5'-3'.

"Cromatina" es la estructura nucleoproteína que comprende el genoma celular. "Cromatina celular" comprende ácido nucleico, principalmente ADN, y proteínas, incluyendo las histonas y proteínas cromosómicas no histonas. Existe la mayoría de la cromatina celular eucariota en forma de nucleosomas, donde un núcleo de nucleosoma comprende aproximadamente 150 pares de bases de ADN asociados con un octámero que comprende dos de cada uno de las histonas H2A, H2B, H3 y H4; y el ADN enlazador (de longitud variable dependiendo del organismo) se extiende entre los núcleos de nucleosomas. Una molécula de histona HI se asocia generalmente con el ADN enlazador. Para los fines de la presente descripción, el término "cromatina" pretende abarcar todos los tipos de nucleoproteína celular, tanto procariotas y eucariotas. Cromatina celular incluye tanto cromosómico y episomal cromatina.

Un "cromosoma" es un complejo de la cromatina que comprende la totalidad o una porción del genoma de una célula. El genoma de una célula a menudo se caracteriza por su cariotipo, que es la colección de todos los cromosomas que componen el genoma de la célula. El genoma de una célula puede comprender uno o más cromosomas.

Un "episoma" es un ácido nucleico de replicación, nucleoproteína estructura compleja o de otro comprende un ácido nucleico que no es parte del cariotipo cromosómico de una célula. Ejemplos de episomas incluyen plásmidos y ciertos genomas virales.

Una "molécula exógena" es una molécula que normalmente no está presente en una célula, pero se puede introducir en una célula mediante uno o más métodos genéticos, bioquímicos u otros. Presencia normal en la célula se determina con respecto a las condiciones de la etapa de desarrollo y ambientales particulares de la célula. Así, por ejemplo, una molécula que está presente sólo durante el desarrollo embrionario del músculo es una molécula exógena con respecto a una célula del músculo adulto. Una molécula exógena puede comprender, por ejemplo, una versión funcional de una molécula endógena mal funcionamiento o una versión mal funcionamiento de una molécula endógena que funciona normalmente.

Una molécula exógena puede ser, entre otras cosas, una molécula pequeña, como es generado por una química combinatoria proceso, o una macromolécula tal como una proteína, ácido nucleico, hidratos de carbono, lípidos, glicoproteína, lipoproteína, polisacárido, cualquier derivado modificado de las moléculas anteriores, o cualquier complejo que comprende una o más de las moléculas anteriores. Los ácidos nucleicos incluyen ADN y ARN, puede ser simple o de doble cadena; puede ser lineal, ramificado o circular; y puede ser de cualquier longitud. Los ácidos nucleicos incluyen aquellos capaces de dúplex que forman, así como ácidos nucleicos formadores de triplex. Véase, por ejemplo, US Pat. Nos. 5.176.996 y 5.422.251. Las proteínas incluyen, pero no se limitan a, las proteínas de

unión al ADN, factores de transcripción, factores de remodelación de la cromatina, metilados proteínas de unión a ADN, polimerasas, metilasas, desmetilasas, acetilasas, histona, quinasas, fosfatasas, integrasas, recombinasas, ligasas, topoisomerasas, girasas y helicasas.

Una molécula exógena puede ser el mismo tipo de molécula como una molécula endógena, por ejemplo, proteína o ácido nucleico (es decir, un gen exógeno), proporcionando que tiene una secuencia que es diferente de una molécula endógena. Los métodos para la introducción de moléculas exógenas en células son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, la transferencia mediada por lípidos (es decir, liposomas, incluyendo lípidos neutros y catiónicos), electroporación, inyección directa, fusión celular, bombardeo de partículas, co-precipitación en fosfato cálcico, transferencia mediada por DEAE-dextrano y transferencia mediada por vector viral.

Por el contrario, una "molécula endógena" es uno que está normalmente presente en una célula particular en una etapa particular del desarrollo bajo condiciones ambientales particulares.

Un "gen endógeno" es un gen que está presente en su contexto genómico y de cromatina normal. Un gen endógeno puede estar presente, por ejemplo, en un cromosoma, un episoma, un genoma bacteriano o un genoma viral.

La frase "adyacente a un sitio de iniciación de la transcripción" se refiere a un sitio diana que está dentro de aproximadamente 50 bases aguas arriba o aguas abajo de un sitio de iniciación de la transcripción. "Corriente arriba" de un sitio de iniciación de la transcripción se refiere a un sitio diana que es más de aproximadamente 50 bases 5 'del sitio de iniciación de la transcripción (es decir, en la región no transcrita del gen). "Aguas abajo" de un sitio de iniciación de la transcripción se refiere a un sitio diana que está más de aproximadamente 50 bases 3 'del sitio de iniciación de la transcripción.

Un "molécula de fusión" es una molécula donde dos o más moléculas de subunidades están unidas, típicamente covalentemente. Las moléculas de subunidades pueden ser del mismo tipo químico de la molécula, o pueden ser de diferentes tipos químicos de moléculas. Ejemplos del primer tipo de molécula de fusión incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos de fusión (por ejemplo, una fusión entre un dominio ZFP de unión al ADN y un dominio de activación transcripcional) y la fusión de ácidos nucleicos (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica la polipéptido de fusión descrito ant.). Ejemplos del segundo tipo de molécula de fusión incluyen, pero no se limitan a, una fusión entre un ácido nucleico formador de triplex y un polipéptido, y una fusión entre una unión al surco menor y un ácido nucleico.

"Expresión génica" se refiere a la conversión de la información, contenida en un gen, en un producto de gen. Un producto génico puede ser el producto transcripcional directo de un gen (por ejemplo, ARNm, ARNt, ARNr, ARN antisentido, ribozima, ARN estructural o cualquier otro tipo de ARN) o una proteína producida por traducción de un ARNm. Los productos génicos también incluyen los ARN que se modifican, por procesos tales como nivelación, poliadenilación, metilación, y edición, y proteínas modificadas, por ejemplo, metilación, acetilación, fosforilación, ubiquitinación, ADP-ribosilación, miristilación, y glicosilación.

"Activación génica" se refiere a cualquier proceso que resulta en un aumento en la producción de un producto génico. Un producto génico puede ser ARN (incluyendo, pero no limitado a, ARNm, ARNr, ARNt, y ARN estructural) o proteína. En consecuencia, la activación de genes incluye aquellos procesos que aumentan la transcripción de un gen y / o traducción de un ARNm. Ejemplos de procesos de activación de genes que aumentan la transcripción incluyen, pero no se limitan a, los que facilitan la formación de un complejo de iniciación de la transcripción, aquellos que aumentan la transcripción tasa de iniciación, los que aumentan la tasa de elongación de la transcripción, aquellos que incrementan el proceso de la transcripción y los que alivian la represión transcripcional (mediante, por ejemplo, el bloqueo de la unión de un represor transcripcional). La activación de genes puede constituir, por ejemplo, la inhibición de la represión así como la estimulación de la expresión por encima de un nivel existente. Ejemplos de procesos de activación génica que incrementan la traducción incluyen aquellos que aumentan la iniciación de la traducción, los que aumentan la elongación de la traducción y los que aumentan la estabilidad del mRNA. En general, la activación génica comprende cualquier incremento detectable en la producción de un producto génico, en algunos casos un aumento en la producción de un producto génico por alrededor de 2 veces, en otros casos de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces o cualquier número entero entre los mismos, en todavía otros casos entre alrededor de 5 y alrededor de 10 veces o cualquier número entero entre los mismos, en todavía otros casos entre alrededor de 10 y alrededor de 20 veces o cualquier número entero entre los mismos, a veces entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 veces o cualquier número entero entre los mismos, en otros casos entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 veces o cualquier número entero entre los mismos, y en otros casos más entre 100 veces o más.

"Represión génica" e "inhibición de la expresión génica" se refieren a cualquier proceso que resulta en una disminución en la producción de un producto génico. Un producto génico puede ser ARN (incluyendo, pero no limitado a, ARNm, ARNr, ARNt, y ARN estructural) o proteína. En consecuencia, la represión de genes incluye aquellos procesos que disminuyen la transcripción de un gen y / o traducción de un ARNm. Ejemplos de procesos de represión de genes que disminuyen la transcripción incluyen, pero no se limitan a, aquellos que inhiben la formación de un complejo de iniciación de la transcripción, aquellos que disminuyen la tasa de iniciación de la transcripción,

aquellos que disminuyen la tasa de elongación de la transcripción, aquellos que disminuyen la capacidad de procesamiento de la transcripción y aquellos que antagonizan activación transcripcional (mediante, por ejemplo, el bloqueo de la unión de un activador transcripcional). La represión de genes puede constituir, por ejemplo, la prevención de la activación así como la inhibición de la expresión por debajo de un nivel existente. Ejemplos de procesos de represión de genes que disminuyen la traducción incluyen aquellos que disminuyen la iniciación de la traducción, los que disminuyen la elongación de la traducción y los que disminuyen la estabilidad del ARNm. Represión transcripcional incluye tanto la inactivación reversible e irreversible de la transcripción génica. En general, la represión génica comprende cualquier disminución detectable en la producción de un producto génico, en algunos casos una disminución en la producción de un producto génico por alrededor de 2 veces, en otros casos de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 veces o cualquier número entero entre los mismos, en otros casos más entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10 veces o cualquier número entero entre los mismos, en todavía otros casos entre alrededor de 10 y alrededor de 20 veces o cualquier número entero entre los mismos, a veces entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 veces o cualquier número entero entre los mismos, en otros casos entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 veces o cualquier número entero entre los mismos, aún en otros casos 100 veces o más. En aún otros casos, la represión de genes resulta en la inhibición completa de la expresión génica, de tal modo que ningún producto de gen es detectable.

"Modulación" se refiere a un cambio en el nivel o magnitud de una actividad o proceso. El cambio puede ser un aumento o una disminución. Por ejemplo, la modulación de la expresión génica incluye tanto la activación de genes y la represión de genes. La modulación puede ensayarse por determinación de cualquier parámetro que directa o indirectamente se ve afectada por la expresión del gen diana (por ejemplo, PLN). Tales parámetros incluyen, por ejemplo, los cambios en los niveles de ARN o proteína, cambios en la actividad de proteínas, cambios en los niveles de productos, cambios en la expresión génica aguas abajo, cambios en la transcripción del gen indicador (luciferasa, CAT, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, proteína fluorescente verde (véase, por ejemplo, Mistili & Specter, Nature Biotechnology 15: 961-964 (1997))); cambios en la transducción de señales, fosforilación y desfosforilación, interacciones receptor-ligando, las concentraciones de segundo mensajero (por ejemplo, cGMP, cAMP, IP3, y Ca^{2+}), el crecimiento celular, y la vascularización. Estos ensayos pueden ser in vitro, in vivo, y vivo. Dichos efectos funcionales pueden medirse por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, la medición de los niveles de ARN o proteína, medición ex de ARN la estabilidad, la identificación de la expresión de genes aguas abajo o informador, por ejemplo, a través de quimioluminiscencia, fluorescencia, reacciones colorimétricas, unión de anticuerpos, marcadores inducibles, ensayos de unión a ligando, cambios en segundos mensajeros intracelulares tales como cGMP e inositol trifosfato (IP3); cambios en los niveles de calcio intracelular; liberación de citoquinas, y similares.

Un "dominio regulador" o "dominio funcional" se refiere a una proteína o un dominio de proteína que tiene actividad de modulación transcripcional cuando atado a un dominio de unión a ADN, es decir, una ZFP. Típicamente, un dominio regulador es covalente o no covalentemente a una ZFP (por ejemplo, para formar una molécula de fusión) para efectuar la modulación de la transcripción. Dominios reguladores pueden ser dominios de activación o represión dominios. Dominios de activación incluyen, pero no se limitan a, VP16, VP64 y la subunidad p65 del factor nuclear kappa-B. Represión dominios incluyen, pero no se limitan a, KOX, KRAB MBD2B y v-ErbA. Dominios reguladores adicionales incluyen, por ejemplo, factores de transcripción y cofactores (por ejemplo, MAD, ERD, SID, el factor de crecimiento inicial de respuesta 1, y los receptores nucleares de hormonas), endonucleasas, integrasas, recombinaciones, metiltransferasas, acetiltransferasas histonas desacetilasas de histonas, etc. Activadores y represores incluyen co-activadores y co-represores (véase, por ejemplo, Utley et al., Nature 394: 498-502 (1998)). Alternativamente, una ZFP puede actuar sola, sin un dominio regulador, para efectuar la modulación de la transcripción.

El término "unido operablemente" o "unido operativamente" se utiliza con referencia a una yuxtaposición de dos o más componentes (tales como elementos de secuencia), en el cual los componentes están dispuestos de manera que ambos componentes funcionan normalmente y permiten la posibilidad de que al menos uno de los componentes puede mediar una función que se ejerce sobre al menos uno de los otros componentes. A modo de ilustración, una secuencia reguladora de la transcripción, tal como un promotor, está unido operativamente a una secuencia codificadora si la secuencia reguladora de la transcripción controla el nivel de transcripción de la secuencia de codificación en respuesta a la presencia o ausencia de uno o más factores reguladores de la transcripción. Una secuencia reguladora de la transcripción unido operativamente generalmente se unió en cis con una secuencia de codificación, pero no tiene por qué ser directamente adyacente a la misma. Por ejemplo, un potenciador puede constituir una secuencia reguladora de la transcripción que está unida operativamente a una secuencia codificante, a pesar de que no son contiguos.

Con respecto a los polipéptidos de fusión, el término "unido operablemente" o "unido operativamente" puede referirse al hecho de que cada uno de los componentes realiza la misma función en vinculación con el otro componente como lo haría si no fuera así vinculado. Por ejemplo, con respecto a un polipéptido de fusión donde un dominio de unión al ADN ZFP está fusionada a un dominio de activación transcripcional (o un fragmento funcional de la misma), el dominio de unión al ADN de ZFP y el dominio de activación transcripcional (o un fragmento funcional de la misma) están en unión operativa si, en el polipéptido de fusión, la porción de dominio ZFP de unión a ADN es capaz de unirse a su sitio diana y / o su sitio de unión, mientras que el dominio de activación transcripcional (o un

fragmento funcional del mismo) es capaz de activar la transcripción.

El término "recombinante", cuando se usa con referencia a una célula, indica que la célula replica un ácido nucleico exógeno, o expresa un péptido o proteína codificada por un ácido nucleico exógeno. Las células recombinantes pueden contener genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula. Las células recombinantes también pueden contener genes encontrados en la forma nativa de la célula donde los genes se modifican y se reintroducen en la célula por medios artificiales. El término también abarca células que contienen un ácido nucleico endógeno a la célula que se ha modificado sin extraer el ácido nucleico de la célula; tales modificaciones incluyen las obtenidas mediante sustitución génica, mutación específica de sitio y técnicas relacionadas.

Un "casete de expresión recombinante", "casete de expresión" o "construcción de expresión" es una construcción de ácido nucleico, generado por recombinación o sintéticamente, que tiene elementos de control que son capaces de efectuar la expresión de un gen estructural que está unido operativamente a los elementos de control en huéspedes compatibles con dichas secuencias. Los casetes de expresión incluyen al menos promotores y opcionalmente, señales de terminación de la transcripción. Típicamente, el casete de expresión recombinante incluye al menos un ácido nucleico que se transcribe (por ejemplo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido deseado) y un promotor. Los factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión también se pueden utilizar como se describe aquí. Por ejemplo, un casete de expresión también puede incluir secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia señal que dirige la secreción de una proteína expresada a partir de la célula huésped. Señales de terminación de la transcripción, potenciadores, y otras secuencias de ácidos nucleicos que influyen en la expresión génica, también pueden incluirse en un casete de expresión.

Un "promotor" se define como un conjunto de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción. Tal como se usa en el presente documento, un promotor incluye típicamente secuencias necesarias de ácido nucleico cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de ciertos promotores de ARN polimerasa II de tipo, un elemento TATA, caja CCAAT, SP-1 sitio, etc. Como se usa en el presente documento, un promotor incluye también opcionalmente potenciador distal o elementos represores, que puede estar situado tanto como varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Los promotores tienen a menudo un elemento que es sensible a la transactivación por un resto de unión a ADN tal como un polipéptido, por ejemplo, un receptor nuclear, Gal4, el represor lac y similares.

Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo bajo la mayoría las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo en ciertas condiciones ambientales o de desarrollo.

Un "promotor débil" se refiere a un promotor que tiene aproximadamente la misma actividad que el promotor de la timidina quinasa ("tk") del virus del herpes simple salvaje ("HSV") o un promotor tk de HSV mutado, como se describe en Eisenberg y McNight, Mol. Cell. Biol. 5: 1940-1947 (1985).

Un "vector de expresión" es una construcción de ácido nucleico, generado por recombinación o sintéticamente, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula hospedadora, y opcionalmente integración o la replicación del vector de expresión en una célula huésped. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o fragmento de ácido nucleico, de origen viral o no viral. Típicamente, el vector de expresión incluye un "casete de expresión", que comprende un ácido nucleico que se transcribe unido operativamente a un promotor. La expresión vector de expresión abarca también DNA desnudo enlazado operativamente a un promotor.

Por "célula huésped" se entiende una célula que contiene un vector de expresión o ácido nucleico, cualquiera de los cuales codifica opcionalmente una ZFP o una proteína de fusión de ZFP. La célula hospedadora soporta típicamente la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células procariotas tales como, por ejemplo, E. coli, o células eucariotas tales como levaduras, hongos, protozoos, plantas superiores, insectos, o células de anfibio, o células de mamífero tales como CHO, HeLa, 293, COS-1, y las células, por ejemplo, como cultivadas (in vitro), explantes y cultivos primarios (in vitro y ex vivo) y células in vivo.

El término "de origen natural", tal como se aplica a un objeto, significa que el objeto puede ser encontrado en la naturaleza, a diferencia de ser producido artificialmente por el ser humano.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido es un análogo o mimético de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de origen natural de aminoácidos. Los polipéptidos pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de residuos de hidratos de carbono para formar glicoproteínas. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" incluyen glicoproteínas, así como no glicoproteínas. Las secuencias de polipéptidos se muestran en el presente documento en la orientación convencional de N-terminal a C-terminal.

Una "subsecuencia" o "segmento" cuando se utiliza en referencia a un ácido nucleico o polipéptido se refiere a una secuencia de nucleótidos o aminoácidos que comprenden una parte de una secuencia más larga de nucleótidos o aminoácidos (por ejemplo, un polipéptido), respectivamente.

- 5 Los términos "tratar" y "tratamiento" como se usan en el presente documento se refieren a la reducción de la gravedad y / o frecuencia de los síntomas, la eliminación de los síntomas y / o causa subyacente, prevención de la aparición de síntomas y / o su causa subyacente, y la mejora o reparación de los daños.

- 10 Por una cantidad "eficaz" (o "terapéuticamente eficaz" cantidad) de una composición farmacéutica se quiere decir una cantidad suficiente, pero no tóxica del agente para proporcionar el efecto deseado. El término se refiere a una cantidad suficiente para tratar a un sujeto. Por lo tanto, la cantidad terapéutica término se refiere a una cantidad suficiente para remediar un estado de enfermedad o los síntomas, mediante la prevención, obstaculizar, retrasar o revertir la progresión de la enfermedad o cualesquiera otros síntomas indeseables de ningún tipo. El término cantidad profilácticamente eficaz se refiere a una cantidad determinada de un tema que aún no tiene la enfermedad, y por lo tanto es una cantidad eficaz para prevenir, impedir o retrasar la aparición de una enfermedad.

II. DESCRIPCIÓN GENERAL

- 20 Una variedad de composiciones y métodos se proporcionan en el presente documento para modular la expresión PLN, con lo que el tratamiento de diversas enfermedades del corazón. Por ejemplo, se proporcionan proteínas de dedo de cinc que son capaces de modular la expresión PLN. También se describen métodos para modular la contractilidad cardíaca poniéndose en contacto con una célula o población de células, tales como en un organismo, con una o más proteínas de dedos de cinc (ZFP) que se unen a secuencias específicas asociadas con el gen PLN. En ciertos métodos, una ZFP se administra y es capaz de unirse a un sitio diana en el gen PLN. Otros métodos implican la administración de una pluralidad de diferentes ZFP que se unen a múltiples sitios diana en el gen PLN.

- 25 Por lo tanto, en el presente documento también se proporcionan diversas proteínas de dedos de cinc que están diseñados para reconocer específicamente y unirse a particular, segmentos de ácido nucleico diana (sitios) en el gen PLN, modulan la expresión de PLN y por lo tanto modulan la contractilidad cardíaca y tratar enfermedades del corazón. En una realización, las ZFP están unidas a dominios reguladores para crear factores de transcripción quiméricos para activar o reprimir la transcripción del gen PLN.

- 30 Con tales ZFP, la expresión de PLN puede mejorarse; con ciertos otros ZFP, la expresión puede ser reprimida. El sitio diana puede ser adyacente a, aguas arriba de, y / o aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción (definido como nucleótido +1). Como se indicó anteriormente, uno o más ZFP pueden utilizarse para modular la expresión de PLN. Por lo tanto, dependiendo de la ZFP (s) particular utilizado, se puede adaptar el nivel donde se expresa el gen PLN.

- 35 En virtud de la capacidad de las ZFP de unirse a los sitios diana y la influencia en la expresión de PLN, las ZFP proporcionadas en el presente documento pueden usarse para tratar una amplia gama de condiciones del corazón. Por ejemplo, la represión de la expresión de PLN se puede lograr utilizando las ZFP descritos en el presente documento, lo que aumenta la contractilidad (por ejemplo, mediante el aumento de SERCA2a: relación de PLN). Así, en ciertas aplicaciones, el ZFP se puede utilizar para reprimir la expresión de PLN, tanto in vitro como in vivo. Tal represión puede usarse por ejemplo para alterar la actividad contráctil del músculo cardíaco y, en consecuencia, como tratamiento para la insuficiencia cardíaca congestiva.

Otros métodos implican la activación de PLN para reducir la contractilidad, por ejemplo, en el tratamiento de la taquicardia y arritmias.

- 40 Además, la inactivación del gen fosfolamban se puede utilizar para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y / o para estimular la contractilidad cardíaca. En estas realizaciones, las proteínas de fusión que comprenden un dominio de dedos de cinc de ingeniería y un dominio de escisión (o escisión medio-dominio) se utilizan para la escisión específica de una secuencia de ADN en el gen fosfolamban endógeno. La escisión dirigida puede dar lugar a la posterior introducción de una mutación en el gen escindido por no homóloga final de la unión; Alternativamente, una o más secuencias pueden insertarse en un gen por recombinación homóloga después de la escisión dirigida. Véanse las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos N° 2003/0232410; 2005/0026157; 2005/0064474 y el documento WO 03/87341 para obtener detalles adicionales relativos a la escisión dirigida y recombinación.

60 III. PROTEÍNAS DEDO DE CINCO PARA REGULAR LA EXPRESIÓN DEL GEN DE FOSFOLAMBAN

A. GENERAL

- 65 Las proteínas dedo de cinc (ZFP) divulgadas en el presente documento son proteínas que pueden unirse a ADN de una manera específica de secuencia. Como se indicó anteriormente, estos ZFP pueden utilizarse para la expresión PLN modulada in vivo o in vitro y, al hacerlo el tratamiento de diversas enfermedades del corazón. Un motivo

ejemplar que caracteriza una clase de estas proteínas, el C 2 H 2 clase, es -Cis- (X) 2 -Cis- (X) 1 2 -His- (X) 3 . 5 His (donde X es cualquier amino .. de ácido) (SEC ID N° I). Varios estudios estructurales han demostrado que el dominio de dedos contiene una hélice alfa que contiene los dos residuos de histidina invariantes y los dos residuos de cisteína invariantes en un giro beta coordinado a través de cinc. Sin embargo, las ZFP proporcionados en el presente documento no se limitan a esta clase particular. Las clases adicionales de proteínas de dedos de cinc son conocidos y también se pueden utilizar en los métodos y composiciones descritos en el presente documento (véase, por ejemplo, Rhodes, et al (1993) Scientific American 268: 56-65 y Solicitud de Patente de Estados Unidos No. de publicación 2003/0108880). En ciertas ZFP, un solo dominio de dedo tiene aproximadamente 30 aminoácidos de longitud. Los dominios de dedo de cinc están implicados no sólo en el reconocimiento del ADN sino también en la unión al ARN y en la unión proteína-proteína .

La estructura cristalina de rayos x de Zif268, un dominio de tres dedos de un factor de transcripción murino, ha sido resuelto en el complejo con una secuencia de ADN cognado y muestra que cada dedo puede estar superpuesto sobre el siguiente por una rotación periódica. La estructura sugiere que cada dedo interacciona independientemente con DNA sobre 3 intervalos de pares de bases, con cadenas laterales en las posiciones -1, 2, 3 y 6 de cada hélice de reconocimiento de hacer contactos con sus respectivos subsitios de tripletes de ADN. El término amino de Zif268 está situado en el extremo 3 'de la hebra de ADN con la que hace que la mayoría de los contactos. Algunos dedos de cinc pueden unirse a una cuarta base en un segmento diana. Si la hebra con la que una proteína de dedos de cinc hace que la mayoría de los contactos se designa la cadena diana, algunas proteínas con dedos de cinc se unen a un triplete de tres bases en la cadena diana y la cuarta base sobre la hebra no diana. La cuarta base es complementaria a la base inmediatamente 3 'del subsitio de tres bases

B. EJEMPLOS DE ZFP

Las ZFP que se unen a sitios diana particulares en el gen PLN se dan a conocer en el presente documento. Los sitios diana pueden estar situados aguas arriba o aguas abajo del sitio de iniciación de la transcripción (definido como nucleótido +1). Los sitios diana pueden incluir, por ejemplo, 9 nucleótidos, 12 nucleótidos o 18 nucleótidos.

Los sitios diana pueden estar situados adyacente a la sitio de iniciación de la transcripción o ser situada significativamente aguas arriba o aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción. En ciertas realizaciones, un solo sitio diana es reconocido por la ZFP (s). En otros casos, múltiples ZFP pueden utilizarse, cada uno reconocer diferentes objetivos en un gen PLN.

Las ZFP que se unen a estos sitios diana típicamente incluyen al menos un dedo de cinc, pero pueden incluir una pluralidad de dedos de cinc (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más dedos). Por lo general, las ZFP incluyen al menos tres dedos. Algunas de las ZFP incluyen cuatro o seis dedos. El ZFP que incluyen tres dedos reconocen típicamente un sitio de destino que incluye 9 o 10 nucleótidos; ZFP de cuatro dedos reconocen un sitio objetivo 12-14 nucleótidos, y ZFP que tienen seis dedos pueden reconocer sitios diana que incluyen 18 a 21 nucleótidos. El ZFP también puede ser proteínas de fusión que incluyen uno o más dominios reguladores, que dominios pueden ser dominios de activación o represión transcripcional.

Ejemplos de proteínas con dedos de cinc que se unen a un sitio diana en un gen PLN se describen en detalle en el Ejemplo 1 y las Tablas 1, 2 y 3. La Tabla 1 muestra la secuencia de nucleótidos del sitio de destino para cada proteína de dedo de cinc y la ubicación del sitio de destino con relación al sitio de inicio de transcripción. Letras minúsculas representan los nucleótidos no contactados directamente por los dedos de cinc constitutivos de la proteína. Véanse, por ejemplo, los documentos WO 01/53480 y US 2003-0119023. Los números negativos se refieren a pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción y los números positivos se refieren a pb aguas abajo del sitio de inicio de la transcripción, donde el sitio de inicio de la transcripción se define como nucleótido +1. Las secuencias PLN examinados para sitios diana incluyen las secuencias de rata (GenBank No. de acceso NW_043442) y (GenBank No. de acceso humanos NT_033944) genes PLN.

Tabla 1

Nombre de la ZFP	Sitio diana (5'-3')	SEC ID	Localización del sitio diana
SBS-6439	GACATGGCCATGGATAGC	15	-2332 (rata)
SBS-6576	GATTGGTACAAGaGTGGGG	16	-2090 (humano)
SBS-6577	AGATTGgTACAAGaGTGGGG	74	-2090 (humano)
SBS-6578	GATTGGTACAAGaGTGGGG	75	-2090 (humano)
SBS-6435	TCACTGGAGGCGGCTTTGG	17	-2172 (rata)
SBS-6437	TTCAAGGATCTGAGCTGCG	18	-2351 (rata)
SBS-6624	AGACAGGATTCAaATCCAG	19	-1650 (humano)
SBS-1563	GAGGCGGCG	70	-250 (humano)

La Tabla 2 muestra las secuencias de aminoácidos incluidas en la región de reconocimiento de cada dedo (F1 a F6) de las diversas proteínas de dedo de cinc diseñadas para unirse a una secuencia diana en el gen de rata PLN. Las

secuencias de aminoácidos mostradas representan residuos -1 a través de 6, como numerados en relación con el primer residuo de aminoácido en la porción alfa helicoidal del dedo de cinc. El subsitio diana reconocida por la secuencia de aminoácidos se muestra en paréntesis.

5

Tabla 2

	SBS-6439	SEC ID	SBS-6435	SEC ID	SBS-6437	SEC ID
F1	TSADLTE (AGC)	20	RSDSLST (TGG)	26	RSDDLST (GCG)	32
F2	ASANLSR (GAT)	21	ASANLSR (CTT)	27	RSADLRK (GCT)	33
F3	RSDALST (ATG)	22	RSDDLST (GCG)	28	RSKTLSE (CTG)	34
F4	DRSTRK (GCC)	23	RNDNRK (GAG)	29	ANSNRK (GAT)	35
F5	RSDVLSA (ATG)	24	RSDALSE (CTG)	30	RSDNLST (AAG)	36
F6	DRSNRIK (GAC)	25	RSDRSTK (TCA)	31	DSSSRK (TTC)	37

La Tabla 3 muestra las secuencias de aminoácidos incluidas en la región de reconocimiento de cada dedo (F1 a F6) de las diversas proteínas de dedo de cinc diseñadas para unirse a una secuencia diana en el gen PLN humano. Las secuencias de aminoácidos mostradas representan residuos -1 a través de 6, como numerados en relación con el primer residuo de aminoácido en la porción alfa helicoidal del dedo de cinc. El subsitio diana reconocida por la secuencia de aminoácidos se muestra en paréntesis.

10

Tabla 3

	SBS-6576	Sec ID	SBS-6624	Sec ID	SBS-1563	Sec ID
F1	RSDHLSQ (GGG)	38	RSDNLSE (CAG)	44	RSDELTR (GCG)	71
F2	RSDVRKN (GTG)	39	HSRSRKT (ATC)	45	RSDELQR (GCG)	72
F3	RSDALSV (AAG)	40	DSESLNA (TCA)	46	RSDNLTR (GAG)	73
F4	DNANRTK (TAC)	41	TSSNLSR (GAT)	47		
F5	RSDHLSQ (TGG)	42	RSDNLST (CAG)	48		
F6	TSSNRK (GAT)	43	QRQHRKT (AGA)	49		

	SBS-6577	Sec ID	SBS-6578	Sec ID
F1	RSDHLSQ (GGG)	76	RSDHLSQ (GGG)	82
F2	RSDVRKN (GTG)	77	RSDVRKN (GTG)	83
F3	RSDALSV (AAG)	78	RSDALSV (AAG)	84
F4	DNANRTK (TAC)	79	DNANRTK (TAC)	85
F5	RSDALST (TTG)	80	TKLHLIE (TGG)	86
F6	QNSHRKT (AGA)	81	QSANLSR (GAT)	87

15

Como se ha indicado anteriormente, los sitios diana pueden ser cualquier longitud, pero son preferiblemente de 9-10 nucleótidos o 18-21 nucleótidos de longitud. Para las ZFP de ejemplo descritas anteriormente, sus sitios diana seleccionados han sido demostrado que presentan una mayor conservación de la secuencia, así como mejorar la accesibilidad DNasa I en ambos (2-1) células H9c2 y miocitos cardíacos primarios de rata.

20

Por lo tanto, como se indica en el presente documento, uno o más de las ZFP descritos en el presente documento pueden ser utilizados para modular la contractilidad cardíaca (y al hacerlo corazón a tratar y otras enfermedades contráctiles), mediante la modulación de la actividad de PLN. Mediante la selección juiciosa de varias ZFP y / o combinaciones de los mismos, se puede adaptar la modulación PLN y, por tanto, modular la contractilidad.

25

IV. CARACTERÍSTICAS DE LAS ZFP

Las proteínas dedo de cinc se forman a partir de componentes de dedos de cinc. Por ejemplo, las proteínas de dedos de cinc pueden tener desde uno hasta treinta y siete dedos, comúnmente que tienen 2, 3, 4, 5 o 6 dedos. Una proteína de dedo de cinc reconoce y se une a un sitio diana (a veces referido como un segmento diana) que representa una parte relativamente pequeña subsecuencia dentro de un gen diana. Cada dedo componente de una proteína de dedo de cinc se puede unir a un subsitio en el sitio de destino. El subsitio incluye un triplete de tres bases contiguas todos en la misma cadena (a veces referido como la cadena diana). El subsitio puede o no puede también incluir una cuarta base en la cadena opuesta que es el complemento de la base inmediatamente 3' de las tres bases contiguas en la cadena diana. En muchas proteínas con dedos de cinc, un dedo de cinc se une a su subsitio de triplete sustancialmente independientemente de otros dedos de la misma proteína de dedo de cinc. En consecuencia, la especificidad de unión de la proteína con dedos de cinc que contiene varios dedos suele ser

30

35

aproximadamente la suma de las especificidades de sus dedos de los componentes. Por ejemplo, si una proteína de dedos de cinc se forma a partir de primero, segundo y tercero dedos que se unen individualmente a trillizos XXX, YYY, y ZZZ, la especificidad de unión de la proteína de dedos de cinc es 3 'XXX YYY ZZZ5'.

El orden relativo de los dedos en una proteína de dedo de cinc a partir de N-terminal a C-terminal determina el orden relativo de tripletes en la dirección 3 'a 5' en el objetivo. Por ejemplo, si una proteína de dedos de cinc comprende de N-terminal a C-terminal de los dedos primero, segundo y tercero que se unen de forma individual, respectivamente, para trillizos 5'GAC3 ', 5'GTA3' y 5'GGC3 ', entonces la proteína de dedos de cinc se une a la 3'CAGATGCGG5 segmento diana '(SEC ID N° 2). Si la proteína de dedos de cinc comprende los dedos en otro orden, por ejemplo, segundos dedos, los dedos primero, tercero de los dedos, a continuación, la proteína de dedos de cinc se une a un segmento diana que comprende una permutación diferente de tripletes, en este ejemplo, 3ATGCAGCGG5 '(SEC ID N° 3). Ver Berg y Shi, Science 271, 1081-1086 (1996). La evaluación de las propiedades de una proteína con dedos de cinc como la suma de sus dedos de los componentes de unión puede, en algunos casos, ser influenciado por las interacciones dependientes del contexto de varios dedos de unión de la misma proteína.

Dos o más proteínas dedo de cinc pueden estar vinculados a tener una especificidad objetivo que es la suma de la de las proteínas con dedos de cinc de componentes (véase, por ejemplo, Kim y Pabo, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95, 2812-2817 (1998)). Por ejemplo, una primera proteína de dedos de cinc que tiene primera, segunda y tercera dedos de componentes que respectivamente se unen a XXX, YYY y ZZZ se pueden vincular a una segunda proteína de dedo de cinc que tiene primera, segunda y tercera dedos componentes con especificidades de unión, AAA, BBB y CCC. La especificidad de unión de las proteínas primera y segunda combinados es por lo tanto 3'XXXXYYZZZ_AAABBBCCC5', donde el subrayado indica una región corta intervenir (típicamente de 0-5 bases de cualquier tipo). En esta situación, el sitio diana puede verse como que comprende dos segmentos diana separados por un segmento intermedio.

La unión puede realizarse usando cualquiera de los siguientes enlazadores peptídicos:

TGEKP: (SEC ID N° 4). (Liu et al, 1997, ant.); (G 4 S) "(SEC ID N° 5) (Kim et al, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 93: 1156-1160 (1996); GGRRGGGS; (SEC ID N° 6) LRQRDGERP; (SEC ID N° 7) LRQKDGGGSERP; (SEC ID N° 8) LRQKD (G 3 S) 2 . ERP (SEC ID N° 9).

Alternativamente, los enlazadores flexibles pueden diseñarse racionalmente utilizando programas de ordenador capaces de modelizar tanto los sitios de unión de ADN- y los propios o por métodos de presentación de fagos de péptidos. En una variación adicional, la vinculación no covalente se puede lograr mediante la fusión de dos proteínas con dedos de cinc con dominios que promueven la formación de heterodímeros de las dos proteínas con dedos de cinc. Por ejemplo, una proteína de dedo de cinc se puede fusionar con fos y el otro con Jun (ver Barbas et al., WO 95/119431).

La unión de dos proteínas con dedos de cinc es ventajoso para conferir una especificidad de unión único dentro de un genoma de mamífero. Un genoma diploide de mamífero típico consta de 3×10^9 pb. Suponiendo que los cuatro nucleótidos A, C, G y T se distribuyen al azar, una secuencia de pares de bases 9 dado está presente aproximadamente 23.000 veces. Así, una ZFP reconocer un objetivo 9 pb con especificidad absoluta tendrían el potencial para unirse a aproximadamente 23.000 sitios dentro del genoma. Una secuencia de 18 pb está presente alrededor de una vez en una secuencia aleatoria de ADN cuya complejidad es diez veces mayor que la de un genoma de mamífero.

Un componente de dedo de la proteína de dedos de cinc contiene típicamente aproximadamente 30 aminoácidos y, en una realización, tiene la siguiente motivo (NC):

Cys- (X) 2 -Cys-XXXXXXXXXXXX-His- (X) 3 . 5 His (SEC ID N° 88)

Los dos residuos de histidina invariantes y los dos residuos de cisteína invariantes en una sola vuelta beta se coordinan a través átomo de cinc (véase, por ejemplo, Berg y Shi, Science 271, 1081-1085 (1996)). El motivo de arriba muestra una convención de numeración que es estándar en el campo de la región de un dedo de cinc que confieren especificidad de unión. El aminoácido de la izquierda (lado N-terminal) de la primera invariante Su residuo se le asigna el número 6, y otros aminoácidos más a la izquierda se asignan progresivamente decreciente números. La hélice alfa comienza en el residuo 1 y se extiende hasta el residuo después de la segunda histidina conservada. Por lo tanto, de longitud variable Toda la hélice es, entre 11 y 13 residuos.

V. DISEÑO DE LAS ZFP

Las ZFP que se proporcionan en el presente documento se han modificado mediante ingeniería para que reconozcan un sitio diana seleccionado en un gen PLN. Ejemplos no limitantes de ZFP adecuadas para modular la expresión de PLN se describen en el presente documento.

El proceso de diseñar o seleccionar una ZFP típicamente comienza con una ZFP natural como fuente de los restos del marco. El proceso de diseño o selección sirve para definir las posiciones no conservadas (es decir, posiciones - 1-6) para conferir una especificidad de unión deseada. Una ZFP adecuado es el dominio de unión a ADN del factor de transcripción de ratón Zif268. El dominio de unión de ADN de esta proteína tiene la secuencia de aminoácidos:

YACPVESCDRRFSRSDLTRHIRHTGQKP (F1) (SEC ID N° 10)
 FQCRICMRNFSRSDHLTTHIRHTGQKP (F2) (SEC ID N° 11)
 FACDICGRKFARSDERKRHTKIHLRQK (F3) SEC ID N° 12)

y se une a un objetivo 5 'TGG GCG GCG 3' (SEC ID N° 13).

Otra proteína natural de los dedos de cinc adecuada como fuente de residuos de marco es Sp-1. La secuencia de Sp-1 utilizado para la construcción de proteínas con dedos de cinc corresponde a los aminoácidos 531 a 624 en el factor de transcripción Sp-1. Esta secuencia es 94 aminoácidos de longitud. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 20030021776 para la secuencia de Spl y una forma alternativa de Sp-1, referida como una secuencia de consenso Sp-1.

Sp-1 se une a un sitio diana 5'GGG GCG GGG3' (SEC ID N° 14).

Hay una serie de reglas de sustitución que ayudan diseño racional de algunas proteínas con dedos de cinc. Por ejemplo, los dominios de unión al ADN de ZFP se pueden diseñar y / o seleccionados para reconocer un sitio diana particular, como se describe en co-propiedad WO 00/42219; WO 00/41566; y US N° de serie 09 / 444.241 presentada el 19 de noviembre 1999; Ser. N° 09 / 535.088 presentada el 23 de marzo 2000; así como la patente US. Nos. 5.789.538; 6.007.408; 6.013.453; 6.140.081; y 6.140.466; y las publicaciones PCT WO 95/19431, WO 98/54311, WO 00/23464 y WO 00/27878. En una realización, un sitio diana para un dominio de unión al ADN de dedos de cinc se identifica de acuerdo a reglas de selección de sitio descrito en co-propiedad WO 00/42219. En una realización preferida, se selecciona una ZFP como se describe en co-propiedad WO 02/077227; Véase también el documento WO 96/06166; Desjariais & Berg, PNAS 90, 2256-2260 (1993); Choo y Klug, PNAS 91, desde 11.163 hasta 11.167 (1994); Desjariais & Berg, PNAS 89, 7.345 a 7349 (1992); . Jamieson et al, Biochemistry 33: desde 5.689 hasta 5.695 (1994); y Choo et al, WO 98/53057, WO 98/53058.; WO 98/53059; . WO 98/53060.

Muchas de estas reglas están respaldadas por mutagénesis dirigida al sitio del dominio de los tres dedos del factor de transcripción ubicuo, Sp-1 (Desjariais y Berg, 1992; 1993). Una de estas reglas es que un 5 'G en un triplete de ADN puede ser obligado por una arginina incorporando dedo de cinc en la posición 6 de la hélice de reconocimiento. Otra regla de sustitución es que una G en el medio de un subsitio puede ser reconocido mediante la inclusión de un residuo de histidina en la posición 3 de un dedo de cinc. Una regla de sustitución adicional es que la asparagina puede ser incorporado para reconocer una en medio de un triplete, ácido aspártico, ácido glutámico, serina o treonina pueden ser incorporados a reconocer C en medio de un triplete, y los aminoácidos con cadenas laterales pequeños, tales como alanina puede ser incorporado para reconocer T en medio de un triplete. Una regla de sustitución adicional es que la base 3 'de un subsitio de triplete puede ser reconocido por la incorporación de los siguientes aminoácidos en la posición -1 de la hélice de reconocimiento: arginina a reconocer G, glutamina para reconocer A, ácido glutámico (o ácido aspártico) a reconocer C, y treonina reconocer T. Aunque estas reglas de sustitución son útiles en el diseño de proteínas con dedos de cinc que no tengan en cuenta todos los posibles sitios de destino. Además, la suposición que subyace a las normas, a saber, que un aminoácido particular en un dedo de cinc es responsable de la unión a una base particular en un subsitio es sólo aproximada. Interacciones dependientes del contexto entre los aminoácidos próximos en un dedo o la unión de múltiples aminoácidos a una sola base o viceversa pueden causar variación de las especificidades de unión predichos por las reglas de sustitución existentes. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, un dominio de unión al ADN ZFP de especificidad predeterminada se obtiene de acuerdo con los métodos descritos en co-propiedad WO 02/077227.

Cualquier método adecuado conocido en la técnica se puede utilizar para diseñar y construir ácidos nucleicos que codifican ZFP, por ejemplo, presentación de fagos, mutagénesis aleatoria, bibliotecas combinatorias, ordenador / diseño racional, selección por afinidad, PCR, clonación a partir de cana o bibliotecas genómicas, construcción sintética y similares, (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 5.786.538; Wu et al. , PNAS 92: 344-348 (1995); Jamieson et al, Biochemistry 33: 5689-5695 (1994); Rebar y Pabo, Science 263: 671-673 (1994); Choo y Klug, PNAS 91: 11163-11167 (1994); Choo y Klug, PNAS 91: 11168 a 11172 (1994); Desjariais & Berg, PNAS 90: 2256-2260 (1993); Desjariais & Berg, PNAS 89: 7345 a 7349 (1992); Pomerantz et al. , Science 267: 93-96 (1995); Pomerantz et al, PNAS 92: 9752 a 9756 (1995); y Liu et al, PNAS 94: 5.525 a 5530 (1997); Griesman y Pabo, Science 275: 657 . -661 (1997); Desjariais & Berg, PNAS 91: 11-99-11103 (1994)).

En ciertas realizaciones preferidas, la especificidad de unión de un dominio de unión a ADN (por ejemplo, un dominio de unión al ADN ZFP) se determina por identificar regiones accesibles en la secuencia en cuestión (por ejemplo, en la cromatina celular). Regiones accesibles pueden determinarse como se describe en co-propiedad WO 01/83732. Véase, también, solicitud de patente US No. 20030021776A1. Un dominio de unión a ADN está diseñado entonces y / o seleccionada como se describe aquí para unirse a un sitio diana dentro de la región accesible.

VI. EJEMPLOS DE PROTEÍNAS DE DEDO DE CINCO Y EQUIVALENTES

En el presente documento se divulgan composiciones y métodos para la regulación de la transcripción y / o para la escisión de ADN específica que son útiles, por ejemplo, en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva y otras deficiencias de la contractilidad cardíaca. Estos incluyen proteínas de fusión que comprenden una proteína de dedo de cinco de ingeniería y un dominio funcional tal como, por ejemplo, un dominio de represión transcripcional, un dominio de activación transcripcional, un dominio de nucleasa o de un medio en el dominio nucleasa. Dominios funcionales adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, sin limitación, dominios de activación transcripcional, tales como, por ejemplo, VP16, VP64 y p65; dominios de represión de la transcripción tales como, por ejemplo, KOX y v-erbA, los dominios de escisión tales como, por ejemplo, Ho y medio de escisión-dominios tales como, por ejemplo, el dominio de escisión de FokI. Uno o más de los mismos o diferentes dominios funcionales pueden estar presentes en una proteína de fusión dada. Ver co-propiedad Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/0160940, incorporada por referencia, para la divulgación de dominios de activación y represión transcripcional ejemplares. La publicación de la solicitud de patente de EE.UU. de propiedad conjunta n° 2005/0.064.474 divulga dominios de escisión y semidominios de escisión de ejemplo.

En ciertas realizaciones, una proteína de dedos de cinco está diseñado para unirse a una secuencia que comprende la secuencia diana GATTGGTACAAGaGTGGGG (SEC ID N° 16), presente aguas arriba del gen humano de fosfolamban (Tabla 1).

Un ejemplo de proteína de dedo de cinco de seis dedos, SBS-6576, que se ha diseñado para unirse a la SEC ID N° 16 tiene la secuencia de aminoácidos:

```
MAPKKKRVGIHGVPAAMAERPFQCRICMRNFSRSDHLSQHIRTHTGKPF
CDICGKKFARSDVRKNHTKIHTGGGGSQRPQCRICMRNFSRSDALSVHIRTHTGK
PFACDICGRKFADNANRTKHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSRSDHLSHIRTHTGK
PFACDICGRKFATSSNRTKHTKIHLRQKDAARGSGMDAKSLTAWSRSLTVTFKDFVD
FTREEWKLLDTAQQIVYRNVMLNENYKLVSLGYQLTKPDVILRLKGEPPWLVERE
HQETHPDSETAFEIKSSVDYKDDDDK (SEC ID N° 69).
```

Los residuos de aminoácidos subrayados en la SEC ID NO: 69 corresponden a los residuos -1 a +6 con respecto al inicio de la parte helicoidal de un dedo de cinco y se indican las "regiones de reconocimiento" porque uno o más de estos residuos participan en la especificidad de secuencia de ácido nucleico de unión. En consecuencia, las proteínas que comprenden las mismas tres regiones de reconocimiento en una secuencia esqueleto del polipéptido diferente se consideran equivalentes a la proteína identificada como SEC ID N° 69, ya que tendrán la misma especificidad de unión al ADN.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las seis regiones de reconocimiento (subrayado en la SEC ID NO: 69 anterior) se puede colocar en cualquier columna vertebral dedo de cinco (véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 6.453.242 y 6.534.261) y la proteína resultante se puede utilizar para regular la transcripción, por ejemplo, para modular la contractilidad cardíaca en el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva y otros trastornos cardíacos. Por consiguiente, las proteínas con dedos de cinco de ingeniería que comprenden la siguiente secuencia se pueden usar en los métodos divulgados:

**C-X₂₋₄-C-X₅-R-S-D-H-L-S-Q-H-X₃₋₅-H-X₇-C-X₂₋₄-C-X₅-R-S-D-V-R-K-N-H-
X₃₋₅-H-X₇-C-X₂₋₄-C-X₅-R-S-D-A-L-S-V-H-X₃₋₅-H-X₇-C-X₂₋₄-C-X₅-D-N-A-N-R-T-K-
H-X₃₋₅-H-X₇-C-X₂₋₄-C-X₅-R-S-D-H-L-S-T-H-X₃₋₅-H-X₇-C-X₂₋₄-C-X₅-T-S-S-N-R-T-
K-H (SEC ID N° 89).**

Dentro de la región de reconocimiento, los residuos -1, +3 y +6 son principalmente responsable de los contactos proteína-nucleótidos. Por consiguiente, los ejemplos no limitantes de equivalentes adicionales incluyen proteínas que comprenden seis dedos de cinco donde el primer dedo contiene un residuo R en -1, un resto H en +3 y un residuo Q en +6 (RXXHXXQ, SEC ID N° 90); el segundo dedo contiene un residuo R en -1, un residuo V a 3 y un residuo de N a +6 (RXXVXXN, SEC ID N° 91); el tercer dedo contiene un residuo R en -1, un residuo A en 3 y un residuo de V en +6 (RXXAXXV, SEC ID N° 92); el cuarto dedo contiene un residuo D en -1, un residuo de N en +3 y un residuo K en +6 (DXXNXXK, SEC ID N° 93); el quinto dedo contiene un residuo R en -1, un resto H en +3 y un residuo T en +6 (RXXHXXT, SEC ID N° 94); y el sexto dedo contiene un residuo T en -1, un residuo de N a 3 y un residuo K en +6 (TXXNXXK, SEC ID N° 95). Así, por ejemplo, las proteínas que comprenden la SEC ID N° 96 se consideran equivalentes para su uso en los métodos divulgados.

C-X_{2,4}-C-X₅-R-X-X-H-X-X-Q-H-X_{3,5}-H-X₇-C-X_{2,4}-C-X₅-R-X-X-V-X-X-N-
H-X_{3,5}-H-X₇-C-X_{2,4}-C-X₅-R-X-X-A-X-X-V-H-X_{3,5}-H-X₇-C-X_{2,4}-C-X₅-D-X-X-N-X-
X-K-H-X_{3,5}-H-X₇-C-X_{2,4}-C-X₅-R-X-X-H-X-X-T-H-X_{3,5}-H-X₇-C-X_{2,4}-C-X₅-T-X-X-
N-X-X-K-H-X_{3,5}-H (SEC ID Nº 96)

Equivalentes adicionales comprenden cualquier ZFP que se une a una secuencia que comprende la secuencia diana GATTGGTACAAGaGTGGGG (SEC ID Nº 16).

Se han descrito las correspondencias entre los aminoácidos en los –residuos de contacto 1, +3 y +6 de la región de reconocimiento de un dedo de cinc, y los nucleótidos en un sitio diana. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.007.988.; 6.013.453; 6.746.838 y 6.866.997; así como las publicaciones PCT WO 96/06166; WO 98/53058; WO 98/53059 y WO 98/53060. Por consiguiente, también para ser considerados equivalentes son proteínas dedo de seis dedos de cinc donde el primer dedo contiene R en -1; H en +3 y R, K, S o T en +6 (y si S o T, también contiene D en la posición 2 del dedo de cinc C-terminal adyacente); el segundo dedo contiene R en -1; A, S o V en +3 y R, K, S o T en +6 (y si S o T, también contiene D en la posición 2 del dedo de cinc C-terminal adyacente); el tercer dedo contiene R en -1; N en +3 y E, N, Q o V en +6 (y si Q, no contiene D en la posición 2 del dedo de cinc C-terminal adyacente); el cuarto dedo contiene D o H en -1; N a 3 y S, T, V o K en +6; el quinto dedo contiene R en -1; H en +3 y S, T, V o K en +6; y el sexto dedo contiene N, H, T o Q en -1; N a +3 y R, K, S o T en +6 (y si S o T, también contiene D en la posición 2 del dedo de cinc C-terminal adyacente).

En ciertas realizaciones adicionales, una proteína de dedos de cinc está diseñado para unirse a una secuencia que comprende la secuencia diana AGACAGGATTCAaATCCAG (SEC ID Nº 19), presente aguas arriba del gen fosfolamban humana (Tabla 1). Un ejemplo de la proteína de dedo de cinc de seis dedos, SBS-6624 (Tabla 3), se ha diseñado para unirse a la SEC ID Nº 19.

Los residuos de aminoácidos mostrados en la Tabla 3 para la proteína de dedos de cinc 6624 corresponden a los residuos a través de -1 a +6 con respecto al inicio de la parte helicoidal de un dedo de cinc y se designan las "regiones de reconocimiento" porque uno o más de estos residuos participan en la especificidad de secuencia de ácido nucleico de unión. En consecuencia, las proteínas que comprenden las mismas tres regiones de reconocimiento en una secuencia estructural polipeptídica diferente se consideran equivalentes a la proteína SBS-6624, ya que tendrán la misma especificidad de unión al ADN.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las seis regiones de reconocimiento de la SBS- 6.624 proteína (Tabla 3) pueden estar presente en cualquier armazón del dedo de cinc (véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 6.453.242 y 6.534.261) y la proteína resultante se puede utilizar para regular la transcripción, por ejemplo, para la modulación de la contractilidad cardíaca. Por consiguiente, las proteínas dedos de cinc modificadas por ingeniería que comprenden la siguiente secuencia se pueden usar en los métodos divulgados:

C-X_{2,4}-C-X₅-R-S-D-N-L-S-E-H-X_{3,5}-H-X₇-C-X_{2,4}-C-X₅-H-S-R-S-R-K-T-H-
X_{3,5}-H-X₇-C-X_{2,4}-C-X₅-D-S-E-S-L-N-A-H-X_{3,5}-H-X₇-C-X_{2,4}-C-X₅-T-S-S-N-L-S-R-
H-X_{3,5}-H-X₇-C-X_{2,4}-C-X₅-R-S-D-N-L-S-Q-H-X_{3,5}-H-X₇-C-X_{2,4}-C-X₅-Q-R-Q-H-R-
K-T-H (SEC ID Nº 97).

Dentro de la región de reconocimiento, los residuos -1, +3 y +6 son los principales responsables de los contactos proteína-nucleótidos. De acuerdo con ejemplos de equivalentes adicionales de SBS-6624 incluyen proteínas que comprenden seis dedos de cinc, no limitativo • donde el primer dedo contiene un residuo R en -1, un residuo N en +3 y un residuo de E a +6 (RXXNXXE, SEC ID Nº 98); el segundo dedo contiene un residuo H en -1, un residuo S en +3 y un residuo K en +6 (HXXSXXK, SEC ID Nº 99); el tercer dedo contiene un residuo D en -1, un residuo S en +3 y un residuo A en +6 (DXXSXXA, SEC ID Nº 100); el cuarto dedo contiene un residuo T en -1, un residuo de N en +3 y un residuo R en +6 (TXXNXXR, SEC ID Nº 101); el quinto dedo contiene un residuo R en -1, un residuo de N en +3 y un residuo Q en +6 (RXXNXXQ, SEC ID Nº 102); y el sexto dedo contiene un residuo Q en -1, un resto H en +3 y un residuo T en +6 (QXXHXXT, SEC ID Nº 103). Así, por ejemplo, proteínas que comprenden la SEC ID Nº 104 se consideran equivalentes para su uso en los métodos divulgados.

C-X₂₋₄-C-X₅-R-X-X-N-X-X-E-H-X₃₋₅-H-X₇-C-X₂₋₄-C-X₅-H-X-X-S-X-X-K-H-X₃₋₅-H-X₇-C-X₂₋₄-C-X₅-D-X-X-S-X-X-A-H-X₃₋₅-H-X₇-C-X₂₋₄-C-X₅-T-X-X-N-X-X-R-H-X₃₋₅-H-X₇-C-X₂₋₄-C-X₅-R-X-X-N-X-X-Q-H-X₃₋₅-H-X₇-C-X₂₋₄-C-X₅-Q-X-X-H-X-X-T-H-X₃₋₅-H (SEC ID Nº 104)

Equivalentes adicionales de SBS-6624 comprenden cualquier ZFP que se une a una secuencia que comprende la secuencia diana AGACAGGATTCAaATCCAG (SEC ID Nº 19).

Se han descrito las correspondencias entre aminoácidos en los residuos de contacto -1, +3 y +6 (y opcionalmente +2) de la región de reconocimiento de un dedo de cinc, y los nucleótidos en un sitio objetivo. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.007.988; 6.013.453; 6.746.838 y 6.866.997; así como las publicaciones PCT WO 96/06166; WO 98/53058; WO 98/53059 y WO 98/53060. Por consiguiente, también para ser considerados equivalentes de SBS-6624 son proteínas con dedos de cinc de seis dedos donde el primer dedo contiene R en -1; N a 3 y S, T, V, A, E o N a 6; el segundo dedo contiene D o H en -1; A, S o V en +3 y E, NV o Q en +6 (y si Q, no contiene D en la posición 2 del dedo de cinc C-terminal adyacente); el tercer dedo contiene Q en -1; S, D, E, L, T, o V en +3 y S, T, V, o K en +6 (y si S o T, también contiene D en la posición 2 del dedo de cinc C-terminal adyacente); el cuarto dedo contiene H, T, N o Q en -1; N en +3 y R, K, S o T en +6 (y si S o T, también contiene D en la posición 2 del dedo de cinc C-terminal adyacente); el quinto dedo contiene R en -1; N en +3 y S, T, V, A, E o N en +6; y el sexto dedo contiene Q en -1; H en +3 y E, N, V o Q en +6 (y si Q, no contiene D en la posición 2 del dedo de cinc C-terminal adyacente).

VII. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS DEDO DE CINCO

A. SÍNTESIS Y CLONACIÓN

Los polipéptidos de ZFP y los ácidos nucleicos que codifican los mismos se pueden fabricar usando técnicas de rutina en el campo de la genética recombinante. Textos básicos que describen métodos generales incluyen Sambrook et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual. (2ª ed 1989.); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); and Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994)). Además, los ácidos nucleicos DE menos de aproximadamente 100 bases pueden solicitarse a la medida en cualquiera de una variedad de fuentes comerciales, tales como The Midland Certified Reagent Company (mcrc@oligos.com), The Great Company de Gene Americana (<http://www.genco.com>), ExpressGen Inc. (www.expressgen.com), Operon Technologies Inc. (Alameda, California). Del mismo modo, los péptidos pueden ser ordenados a la medida de cualquiera de una variedad de fuentes, tales como PeptideGenic (pkim@ccnet.com), HTI Bio-Products, Inc. (<http://www.htibio.com>), BMA Biomedicals Ltd (Reino Unido), Bio.Synthesis, Inc.

Los oligonucleótidos pueden sintetizarse químicamente de acuerdo con el método del triéster de fosoramidita en fase sólida descrito por primera vez por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letts. 22: 1859-1862 (1981), utilizando un sintetizador automatizado, como se describe en Van Devanter et al, Nucleic Acids Res. 12: 6.159 a 6.168 (1984). La purificación de los oligonucleótidos es por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante o por HPLC de fase inversa. La secuencia de los genes clonados y oligonucleótidos sintéticos se puede verificar después de la clonación usando, por ejemplo, el método de terminación de la cadena para la secuenciación de las plantillas de doble cadena de Wallace y otros, Gene 16: 21-26 (1981).

Dos métodos alternativos se utilizan normalmente para crear las secuencias codificantes requeridas para expresar los péptidos de unión al ADN de nuevo diseño. Un protocolo es un procedimiento de ensamblaje basado en la PCR, que utiliza seis oligonucleótidos solapantes. Tres oligonucleótidos corresponden a secuencias "universales" que codifican porciones del dominio de unión al ADN entre las hélices de reconocimiento. Estos oligonucleótidos normalmente se mantienen constantes para todas las construcciones con dedos de cinc. Los otros tres oligonucleótidos "específicos" están diseñados para codificar las hélices de reconocimiento. Estos oligonucleótidos contienen sustituciones fundamentalmente en las posiciones -1, 2, 3 y 6 en las hélices de reconocimiento haciéndolos específico para cada uno de los diferentes dominios de unión al ADN.

La síntesis mediante PCR se lleva a cabo en dos etapas. En primer lugar, se crea un molde de ADN de doble cadena mediante la combinación de los seis oligonucleótidos (tres universales, tres específicos) en una reacción PCR de cuatro ciclos con un paso de hibridación a baja temperatura, de modo que se hibridan los oligonucleótidos para formar un "armazón" de ADN. Los huecos en el armazón se rellenan mediante la polimerasa termoestable de alta fidelidad, la combinación de las polimerasas Taq y Pfu también es suficiente. En la segunda fase de la construcción, la plantilla de dedos de cinc se amplifica mediante cebadores externos diseñados para incorporar sitios de restricción en cada extremo para la clonación en un vector lanzadera o directamente en un vector de expresión.

Un método alternativo de clonación de las proteínas de unión al ADN de nuevo diseño se basa en la hibridación de oligonucleótidos complementarios que codifican las regiones específicas de la ZFP deseada. Esta aplicación particular requiere que los oligonucleótidos ser fosforilados antes del paso de ligación final. Esto se realiza generalmente antes de la creación de las reacciones de hibridación. En breve, los oligonucleótidos "universales" que codifica las regiones constantes de las proteínas (oligos 1, 2 y 3 de arriba) se hibridan con sus oligonucleótidos complementarios. Además, los oligonucleótidos "específicos" que codifican las hélices de reconocimiento dedo se templean con sus respectivos oligonucleótidos complementarios. Estos oligos complementarios están diseñados para rellenar la región que se rellenó previamente en por la polimerasa en el protocolo anteriormente mencionado. Los oligonucleótidos complementarios a los oligos 1 y 6 están diseñados para dejar que sobresale por secuencias específicas para los sitios de restricción utilizados en la clonación en el vector de elección en el siguiente paso. El segundo protocolo de ensamblaje difiere del protocolo inicial en los siguientes aspectos: el "andamio" que codifica la ZFP de nuevo diseño está compuesto enteramente por DNA sintético eliminando así el paso de relleno de la polimerasa, adicionalmente el fragmento a clonar en el vector no requiere amplificación. Por último, el diseño de los salientes específicos de secuencia elimina la necesidad de digestiones con enzimas de restricción del fragmento de inserción. Alternativamente, los cambios en hélices de reconocimiento de ZFP se pueden crear utilizando los métodos convencionales de mutagénesis dirigida al sitio.

Ambos métodos de ensamblaje requieren que el fragmento resultante que codifica la ZFP de nuevo diseño se liga en un vector. En última instancia, la secuencia de codificación de ZFP se clona en un vector de expresión. Los vectores de expresión que se utilizan comúnmente incluyen, pero no se limitan a, un vector modificado pMAL-c2 bacteriana expresión (New England Biolabs, Beverly, Mass.) O un vector de expresión eucariota, pcDNA (Promega, Madison, Wis.). Las construcciones finales se verifican por análisis de secuencia.

Cualquier método adecuado de purificación de proteínas conocidos por los expertos en la técnica se puede utilizar para purificar ZFP (véase, Ausubel, ant., Sambrook, ant.). Además, cualquier huésped adecuado se puede utilizar para la expresión, por ejemplo, células bacterianas, células de insecto, células de levadura, células de mamífero, y similares.

La expresión de una proteína de dedos de cinc fusionada a una proteína de unión a maltosa (MBP-ZFP) en la cepa bacteriana JM109 permite la purificación directa a través de una columna de amilosa (New England Biolabs, Beverly, Mass.). Los niveles altos de expresión de la proteína quimérica de dedos de cinc pueden obtenerse por inducción con IPTG desde la fusión MBP-ZFP en el plásmido de expresión pMal-c2 está bajo el control del promotor tac (New England Biolabs, Beverly, Mass.). Las bacterias que contienen los plásmidos de fusión MBP-ZFP se inoculan en medio 2xYT que contiene 10 mM de $ZnCl_2$, 0,02% de glucosa, más 50 mg / ml de ampicilina y se agitó a 37 ° C. A mediados del crecimiento exponencial se añade IPTG a 0,3 mM y se dejan agitar los cultivos. Después de 3 horas las bacterias se recogieron por centrifugación, se rompen por sonicación o mediante el paso a través de una celda de presión o mediante el uso de lisozima, y el material insoluble se elimina por centrifugación. Las proteínas MBP-ZFP se capturan en una resina de amilosa unido, se lavaron extensamente con tampón que contiene 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), NaCl 200 mM, DTT 5 mM y $ZnCl_2$ 50 μ M, a continuación, se eluyeron con maltosa en esencialmente el mismo tampón (la purificación se basa en un protocolo estándar de New England Biolabs. Las proteínas purificadas se cuantifican y se almacena para el análisis bioquímico.

La constante de disociación de una proteína purificada, por ejemplo, K_d, se caracteriza típicamente por medio de ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) (Buratowski y Chodosh, en Current Protocols in Molecular Biología pp. 12.2.1-12.2.7 (Ausubel ed., 1996)). La afinidad se mide por titulación de la proteína purificada contra una cantidad fija de marcado diana de doble cadena de oligonucleótidos. El objetivo típicamente comprende la secuencia del sitio de unión natural flanqueada por el pb 3 encontrados en la secuencia natural y constantes, secuencias flanqueantes adicionales. El sitio de unión natural es típicamente 9 pb para una proteína de tres dedos y BP 2.times.9 + bases que intervienen para una ZFP de seis dedos. Los objetivos de oligonucleótidos hibridados poseen un 1 base 5 'voladizo que permite el etiquetado eficiente de la diana con polinucleótido quinasa del fago T4. Para el ensayo se añade la diana a una concentración de 1 nM o inferior (la concentración real se mantiene al menos 10 veces menor que la disociación esperada constante), se añaden ZFP purificados a diversas concentraciones, y la reacción se deja equilibrar durante por lo menos 45 min. En adición, la mezcla de reacción contiene también Tris 10 mM (pH 7,5), KCl 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM, $ZnCl_2$ 0,1 mM, DTT 5 mM, 10% de glicerol, 0,02% de BSA.

Las reacciones equilibradas se cargan en un 10% gel de poliacrilamida, que ha sido pre-carrera por 45 min en tampón Tris / glicina, a continuación, atado y diana marcado no unido se resolvió por electroforesis a 150 V. Alternativamente, el 10-20% de gradiente de geles de Tris-HCl, que contienen una poliacrilamida 4% de gel de apilamiento, se pueden utilizar. Los geles secados se visualizan por autorradiografía o fósforoimagen y la aparente K_d se determina calculando la concentración de proteína que produce la unión semimáxima.

Los ensayos también pueden incluir una determinación de la fracción activa en las preparaciones de proteína. La fracción activa se determina por cambios de gel estequiométricos donde la proteína se valora en contra de una alta concentración de ADN diana. Las titulaciones se realizan a 100, 50, y 25% del objetivo (usualmente a niveles micromolares).

B. EXPRESIÓN EN FAGOS

La técnica de expresión en fagos proporciona un medio ampliamente empíricos de la generación de proteínas dedo de cinc con especificidad objetivo deseado (véase, por ejemplo, Rebar, US 5.789.538; Choo et al, WO 96/06166;.. Barbas et al, WO 95 / 19431 y WO 98/543111; Jamieson et al, ant.). El método puede ser utilizado en conjunción con, o como una alternativa al diseño racional. El método implica la generación de diversas bibliotecas de proteínas de dedo de cinc mutagenizadas, seguida por el aislamiento de proteínas con propiedades de unión al ADN deseados utilizando los métodos de selección de afinidad. Para utilizar este método, el experimentador típicamente procede como sigue. En primer lugar, un gen para una proteína de dedo de cinc se mutagenizó para introducir diversidad en regiones importantes para especificidad y / o afinidad de unión. En una aplicación típica, esto se logra a través de la aleatorización de un solo dedo en las posiciones -1, + 2, -1 a +3, y +6, y, a veces posiciones accesorias tales como +1, + 5, + 8 y +10. A continuación, el gen mutagenizado se clona en un fago o vector fagemido como una fusión con el gen III de un fago filamentoso, que codifica la proteína de la cubierta pIII. Se inserta el gen del dedo de cinc entre los segmentos de gen III que codifican el péptido señal de exportación de membrana y el resto de pIII, de modo que la proteína dedos de cinc se expresa como una fusión amino-terminal con pIII o en el, proteína procesada madura.

Cuando se utilizan vectores fagemidos, el gen mutagenizado del dedo de cinc también pueden fusionarse a una versión truncada del gen III que codifica, mínimamente, la región C-terminal requerido para el montaje de pIII en la partícula de fago. La biblioteca de vector resultante se transforma en *E. coli* y se utiliza para producir fago filamentoso que expresan proteínas con dedos de cinc variantes en su superficie como fusiones con la píldora proteína de la cubierta. Si se utiliza un vector de fagemido, entonces este paso requiere superinfección con fago auxiliar. La biblioteca de fagos se incuba luego con un sitio de ADN diana, y los métodos de selección por afinidad se utilizó para aislar fagos que se unen diana con alta afinidad del fago a granel. Típicamente, la diana de DNA se inmoviliza sobre un soporte sólido, que se lava luego en condiciones suficientes para eliminar todos pero el fago de unión más apretada. Después del lavado, cualquier fago restante en el soporte se recupera a través de elución en condiciones que interrumpen con dedos de cinc de unión al ADN. Los fagos recuperados se utilizan para infectar *E. coli* frescas, que luego se amplifican y se utilizan para producir un nuevo lote de partículas de fago. La selección y amplificación se repiten tantas veces como sea necesario para enriquecer el grupo de fagos para aglutinantes ajustados de tal manera que estos puedan identificarse utilizando la secuenciación y / o métodos de cribado. Aunque el método se ilustra para las fusiones de la píldora, principios análogos se pueden utilizar para cribar variantes de ZFP como fusiones pVIII.

En ciertas realizaciones, la secuencia unida por una proteína con dedos de cinc particular se determina mediante la realización de reacciones de unión (véase, por ejemplo, las condiciones para la determinación de K_d, ant.) entre la proteína y un grupo de secuencias de oligonucleótidos de doble cadena aleatorios. La reacción de unión se analizó mediante un ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA), donde los complejos de proteína-DNA se someten a la migración retardada en un gel y se pueden separar del ácido nucleico no unido. Los oligonucleótidos que se han unido el dedo se purifican del gel y se amplificaron, por ejemplo, por una reacción en cadena de la polimerasa. La selección (es decir, reacción de unión y análisis EMSA), entonces se repite tantas veces como se desee, con las secuencias de oligonucleótidos seleccionadas. De esta manera, se determina la especificidad de unión de una proteína de dedos de cinc que tiene una secuencia de aminoácidos particular.

C. DOMINIOS REGULADORES

Las proteínas dedo de cinc se expresan a menudo con un dominio exógeno (o fragmento funcional del mismo) como proteínas de fusión. Dominios comunes para además de la ZFP incluyen, por ejemplo, los dominios del factor de transcripción (activadores, represores, compañeros de activadores, co-represores), silenciadores, oncogenes (por ejemplo, myc, jun, fos, myb, máximo, enojado, rel, ets, miembros bcl, myb, mos familiares, etc.); Enzimas de reparación del ADN y sus factores y modificadores asociados; Enzimas de reordenamiento de DNA y sus factores y modificadores asociados; las proteínas asociadas a la cromatina y sus modificadores (por ejemplo, quinasas, acetilasas y desacetilasas y enzimas modificadoras del ADN (por ejemplo, las metiltransferasas, topoisomerasas, helicasas, ligasas, quinasas, fosfatasas, polimerasas, endonucleasas) y sus factores asociados y modificadores. Un dominio preferido para la fusión con una ZFP cuando la ZFP se va a utilizar para reprimir la expresión de un gen diana es un dominio de represión KRAB de la proteína KOX-1 humana (Thiesen et al., *New Biologist* 2, 363-374 (1990) ; Margolin et al, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 91, 4509-4513 (1994); Pengue et al, *Nucl Acids Res* 22 2908-2914 (1994); Witzgall et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4514-4518 (1994). dominios preferidos para lograr la activación incluyen el dominio de activación VP16 de HSV (véase, por ejemplo, Hagmann et al., *J. Virol.* 71, 5952-5962 (1997)) receptores nucleares de hormonas (véase, por ejemplo, Torchia et al, *Curr Opin Cell Biol* 10: . 373-383 (1998)); la subunidad p65 del factor nuclear kappa B (Bitko y Barik, *J. Virol.* 72: 5610-5618 (1998) y Doyle y Hunt, *Neuroreport* 8: 2937-2942 (1997)); Liu et al, *Cancer Gene Ther* 5:3-28 (1998)), o dominios funcionales quiméricos artificiales tales como VP64 (Seifpal et al., *EMBO J.* 11, desde 4.961 - 4.968 (1992)).

La identificación de nuevas secuencias y regiones accesibles (por ejemplo, DNasa I sitios hipersensibles) en los genes PLN permite el diseño de moléculas de fusión para el tratamiento de condiciones del corazón . Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones y métodos descritos en el presente documento implican fusiones entre

un dominio de unión a ADN dirigido específicamente a una o más regiones reguladoras de un gen PLN y un polinucleótido que codifica un tal funcional (por ejemplo, la represión o activación) de dominio (o fusión). De esta manera, el dominio de represión o la activación se pone en proximidad con una secuencia en el gen que está unido por el dominio de unión a ADN. La función reguladora de la transcripción del dominio funcional es entonces capaz de actuar en las secuencias reguladoras seleccionadas.

En realizaciones adicionales, la remodelación de la cromatina específica, como se describe en co-propiedad WO 01/83793 se puede utilizar para generar uno o más sitios en la cromatina celular que son accesibles a la unión de una molécula de unión a ADN.

Las moléculas de fusión se construyen mediante métodos de clonación y la conjugación bioquímica que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las moléculas de fusión comprenden un dominio de unión a ADN y un dominio funcional (por ejemplo, una activación de la transcripción o dominio de represión). Las moléculas de fusión también comprenden opcionalmente señales de localización nuclear (tales como, por ejemplo, que a partir del medio antígeno T de SV40) y marcadores de epítipo (tales como, por ejemplo, FLAG y hemaglutinina). Las proteínas de fusión (y los ácidos nucleicos que las codifican) están diseñados de tal manera que el marco de lectura traduccional se conserva entre los componentes de la fusión.

Las fusiones entre un componente de polipéptido de un dominio funcional (o un fragmento funcional de la misma), por un lado, y un no dominio de unión a ADN-proteína (por ejemplo, antibiótico, intercalador, unión al surco menor, el ácido nucleico) en el otro, se construyen por métodos de conjugación bioquímica conocida por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, el Pierce Chemical Company (Rockford, IL) Catalogue. Métodos y composiciones para hacer fusiones entre una unión al surco menor y un polipéptido que se han descrito. Mapp et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97: 3930 a 3935.

La Figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de las proteínas de fusión que comprenden ZFP como se describe en el presente documento que se unen a un gen PLN y modular la expresión de PLN. La Tabla 4 muestra las ubicaciones de los diferentes dominios funcionales dentro de estas proteínas de fusión, numerados por el resto de aminoácido con respecto a la N-terminal de las secuencias de aminoácidos se muestra en la Figura 1. "NLS" se refiere a una señal de localización nuclear derivada por ejemplo de SV40 grande -T antígeno. Un dominio "Kox" se refiere a un dominio regulador que actúa como un represor de la transcripción y se deriva de cajas KRAB-A / B en KOX1 humana, como se describe anteriormente. "FLAG" es un marcador de epítipo sintético.

Tabla 4

	NLS	SBS-6439	Kox	FLAG
Fusión que comprende SBS-6439	3-9	19-197	211-297	298-305
Fusión que comprende SBS-6576	3-9	18-198	212-298	299-306

En ciertas realizaciones, el sitio diana unido por la proteína de dedos de cinc está presente en una región accesible de la cromatina celular. Regiones accesibles se pueden determinar como se describe, por ejemplo, en co-propiedad Publicación Internacional WO 01/83732. Si el sitio de destino no está presente en una región accesible de la cromatina celular, una o más regiones accesibles se pueden generar como se describe en co-propiedad WO 01/83793. En realizaciones adicionales, el dominio de unión a ADN de una molécula de fusión es capaz de unirse a la cromatina celular, independientemente de si su sitio diana está en una región accesible o no. Por ejemplo, dichos dominios de unión al ADN son capaces de unirse al engarce de ADN y / o ADN nucleosomal. Ejemplos de este tipo de dominio de unión a ADN "Pioneer" se encuentran en cierto receptor de esteroides y en el factor nuclear de hepatocitos 3 (HNF3). Cordingley et al. (1987) Cell 48: 261-270; Pina et al. (1990) Cell 60: 719-731; y Cirillo et al. (1998) EMBO J. 17: 244-254.

Para tales aplicaciones, la molécula de fusión se formula típicamente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como es conocido por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Pharmaceutical Sciences de Remington, 17ª ed., 1985; y co-propiedad WO 00/42219.

El componente / dominio funcional de una molécula de fusión se puede seleccionar de cualquiera de una variedad de diferentes componentes capaces de influir en la transcripción de un gen una vez que la molécula de fusión se une a una secuencia diana a través de su dominio de unión a DNA. Por lo tanto, el componente funcional puede incluir, pero no se limita a, diversos dominios del factor de transcripción, tales como activadores, represores, co-activadores, co-represores, y silenciadores.

Un dominio funcional de ejemplo para fusionarse con un dominio de unión a ADN tales como, por ejemplo, una ZFP, que debe utilizarse para reprimir la expresión de un gen es un dominio de represión KRAB de la KOX-1 proteína humana (véase, por ejemplo, Thiesen et al, New Biologist 2, 363-374 (1990); Margolin et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 91, 4509 a 4.513 (1994); Pengue et al, Nucl Acids Res 22: 2908-2914 (1994); Witzgall et al, Proc Natl. Acad. Sci. EE.UU. 91, 4514 a 4518 (1994). Otra represión de dominio adecuado es vinculante metilo proteína de dominio

2B (MBD-2B) (véase, también Hendrich et al. (1999) *Mamm Genoma* 10: 906-912 para la descripción de las proteínas MBD). Otra represión de dominio útil es el asociado a la proteína v-ErbA. Véase, por ejemplo, Damm, et al. (1989) *Nature* 339: 593-597; Evans (1989) *Int. J. Cancer Suppl.* 4: 26-28; Pain et al. (1990) *Nueva Biol.* 2: 284-294; Sap et al. (1989) *Nature* 340: 242-244; Zenke et al. (1988) *Cell* 52: 107-119; y Zenke et al. (1990) *Cell* 61: 1035-1049.

Los dominios adecuados para conseguir activación incluyen el dominio de activación HSV VP16 (véase, por ejemplo, Hagmann et al, *J. Virol* 71, 5952 a 5962 (1997)) dominios adecuados para lograr la activación incluyen el dominio de activación HSV VP16 receptores nucleares de hormonas (véase, por ejemplo, Torchia et al, *Curr Opin Cell Biol* 10: 373-383 (1998)); la subunidad p65 del factor nuclear kappa B (Bitko y Barik, *J. Virol* 72: 5.610-5618 (1998) y Doyle y Hunt, *Neuroreport* 8: 2937-2942 (1997)); Liu et al., *Cancer Gene Ther.* 5: 3-28 (1998)), o dominios funcionales quiméricos artificiales tales como VP64 (Seifpal et al, *EMBO J.* 11, 4.961 a 4.968 (1992).). Dominios de activación ejemplares adicionales incluyen, pero no se limitan a, VP16, VP64, p300, CBP, PCAF, SRC1, PvALF, AtHD2A y ERF-2. Véase, por ejemplo, Robyr et al. (2000) *Mol. Endocrinol.* 14: 329-347; Collingwood et al. (1999) *J. Mol. Endocrinol.* 23: 255-275; Leo et al. (2000) *de Gene* 245: 1-11; Manteuffel-Cymborowska (1999) *Acta Biochim. Pol.* 46: 77-89; McKenna et al. (1999) *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 69: 3-12; Malik et al. (2000) *Trends Biochem. Sci.* 25: 277-283; y Limón et al. (1999) *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9: 499-504. Dominios de activación ejemplares adicionales incluyen, meta enviaban limitado a, OsGAI, MEDIA-1, CI, API, ARF-5, -6, -7, -8 y, CPRFI, CPRF4, MYC-RP / GP y TRAB1. Véase, por ejemplo, Ogawa et al. (2000) *de Gene* 245: 21-29; Okanami et al. (1996) *Genes Cells* 1: 87-99; Goff et al. (1991) *Genes Dev.* 5: 298-309; Cho et al. (1999) *Plant Mol. Biol.* 40: 419-429; Ulmason et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96: 5844 hasta 5849; Haussels-Sprenger et al. (2000) *Plant J.* 22: 1-8; Gong et al. (1999) *Plant Mol. Biol.* 41: 33-44; y Hobo et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 96 : 15,348-15,353.

Ejemplos de dominios de represión adicionales incluyen, entre otros, KRAB (también conocida como "KOX"), SID, MBD2, MBD3, miembros de la familia DNMT (por ejemplo, DNMT1, Dnmt3a, DNMT3B) , Rb, y MeCP2. Véase, por ejemplo, Bird et al. (1999) *Cell* 99: 451-454; Tyler et al. (1999) *Cell* 99: 443-446; Knoepfler et al. (1999) *Cell* 99: 447-450; y Robertson et al. (2000) *Nature Genet.* 25: 338-342. Represión dominios ejemplares adicionales incluyen, meta enviaban limitado a, ROM2 y AtHD2A. Véase, por ejemplo, Chem et al. (1996) *Plant Cell* 8: 305-321; y Wu et al. (2000) *Plant J.* 22 : 19-2.

Dominios funcionales de ejemplo adicionales se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos de propiedad conjunta N° 6.534.261 y la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos número 2002/0160940.

D. VECTORES DE EXPRESIÓN

El ácido nucleico que codifica la ZFP de elección se clona típicamente en vectores intermedios para transformación en células procariotas o eucariotas para replicación y / o expresión, por ejemplo, para la determinación de Kd. Los vectores intermedios son típicamente vectores procariotas, por ejemplo, plásmidos, o vectores lanzadera, o vectores de insecto, para almacenamiento o manipulación del ácido nucleico que codifica ZFP o la producción de proteína. El ácido nucleico que codifica una ZFP se clona también típicamente en un vector de expresión, para la administración a una célula de planta, célula animal, preferiblemente una célula de mamífero o una célula humana, célula fúngica, célula bacteriana, o célula de protozoo.

Para obtener la expresión de un clonado gen o ácido nucleico, una ZFP está típicamente subclonaron en un vector de expresión que contiene un promotor para dirigir la transcripción. Promotores bacterianos y eucariotas adecuados son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed 1989).; Kriegler, *transferencia de genes y de expresión: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994). Sistemas de expresión bacterianos para expresar la ZFP están disponibles en, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus* sp., y *Salmonella* (Palva et al, *Gene* 22: 229-235 (1983)). Kits para tales sistemas de expresión están disponibles comercialmente. Sistemas de expresión eucariotas para células de mamíferos, levaduras y células de insecto son bien conocidos en la técnica y también están disponibles comercialmente.

El promotor utilizado para dirigir la expresión de un ácido nucleico de ZFP depende de la aplicación particular. Por ejemplo, un promotor constitutivo fuerte se utiliza típicamente para la expresión y purificación de ZFP. En contraste, cuando se administra una ZFP in vivo para regulación génica, ya sea una constitutivo o un promotor inducible se utiliza, dependiendo del uso particular de la ZFP. Además, un promotor preferido para administración de una ZFP puede ser un promotor débil, tal como TK del HSV o un promotor que tiene actividad similar. El promotor puede incluir también típicamente elementos que son sensibles a la transactivación, por ejemplo, elementos de respuesta a la hipoxia, elementos de respuesta Gal4, elemento de respuesta represor lac, y sistemas de control de moléculas pequeñas tales como sistemas regulados por tet y el sistema RU-486 (véase, por ejemplo, Gossen y Bujard, *PNAS* 89: 5547 (1992); Oligino et al, *Ther Gen* 5: 491-496 (1998); Wang et al, *Ther de Gene* 4: 432-441 (1997); Neering et al., *Blood* 88: 1147-1155 (1996); y Rendahl et al, *Nat Biotechnol* 16: 757-761 (1998)).

Además del promotor, el vector de expresión contiene típicamente una unidad de transcripción o casete de expresión que contiene todos los elementos adicionales requeridos para la expresión del ácido nucleico en células huésped, o bien procarióticas o eucarióticas. Así, un casete de expresión típico contiene un promotor unido operativamente, por ejemplo, a la secuencia de ácido nucleico que codifica la ZFP, y señales requeridas, por ejemplo, para la poliadenilación eficiente del transcrito, terminación de la transcripción, sitios de unión a ribosomas, o terminación de la traducción. Elementos adicionales del casete pueden incluir, por ejemplo, potenciadores, y señales intrónicas de corte y empalme exógenas.

El vector de expresión particular utilizado para transportar la información genética en la célula se selecciona con respecto a la utilización prevista de la ZFP. Vectores de expresión bacterianos estándar incluyen plásmidos tales como plásmidos basados en pBR322, pSKF, pET23d, y sistemas de expresión de fusión disponibles comercialmente tales como GST y LacZ. Una proteína de fusión preferida es la proteína de unión a maltosa, "MBP." Tales proteínas de fusión se utilizan para purificación de la ZFP. Etiquetas de epítipo también se pueden añadir a las proteínas recombinantes para proporcionar métodos convenientes de aislamiento, para la vigilancia de expresión, y para el seguimiento de la localización celular y subcelular, por ejemplo, c-myc o FLAG.

Los vectores de expresión que contienen elementos reguladores de virus eucariotas se utilizan a menudo en la expresión eucariota vectores, por ejemplo, vectores de SV40, vectores de virus del papiloma, y vectores derivados del virus de Epstein-Barr. Otros vectores eucariotas ejemplares incluyen pMSG, pAV009 / A +, pMTO10 / A +, pMAMneo-5, baculovirus pDSVE, y cualquier otro vector que permite la expresión de proteínas bajo la dirección del promotor temprano de SV40, SV40 promotor tardío, promotor de la metalotioneína, virus del tumor mamario murino promotor, promotor del virus del sarcoma de Rous, promotor de polihedrina, u otros promotores que se ha demostrado que son eficaces para la expresión en células eucariotas.

Algunos sistemas de expresión tienen marcadores para la selección de líneas celulares transfectadas de manera estable tales como timidina quinasa, higromicina B fosfotransferasa y dihidrofolato reductasa. Sistemas de expresión de alto rendimiento también son adecuados, tales como el uso de un vector de baculovirus en células de insecto, con una secuencia de codificación de ZFP bajo la dirección del promotor de polihedrina u otros promotores de baculovirus fuertes.

Los elementos que se incluyen típicamente en vectores de expresión también incluyen un replicón que funciones en *E. coli*, un gen que codifica resistencia a los antibióticos para permitir la selección de bacterias que albergan plásmidos recombinantes, y sitios de restricción únicos en regiones no esenciales del plásmido para permitir la inserción de secuencias recombinantes.

Se usan métodos de transfección estándar para producir líneas celulares bacterianas, de mamífero, de levadura o de insecto que expresan grandes cantidades de proteínas, que son luego purificados usando técnicas estándar (véase, por ejemplo, Colley et al, *J. Biol Chem.* 264: 17619 a 17622 (1989); *Guide to Protein Purification*, en *Métodos in Enzymology*, vol. 182 (Deutscher, ed., 1990)). La transformación de células eucariotas y procariotas se realiza de acuerdo con técnicas estándar (véase, por ejemplo, Morrison, *J. Bact* 132: 349-351 (1977); Clark-Curtiss y Curtiss, *Methods in Enzymology* 101: 347-362 (Wu et al., eds, 1983).

Puede usarse cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extraños en células huésped. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, ADN desnudo, vectores plasmídicos, vectores virales, tanto episomal e integradora, y cualquiera de los otros métodos bien conocidos para introducir ADN clonado genómico, ADNc, ADN sintético u otro material genético extraño en una célula huésped (véase, por ejemplo, Sambrook et al., ant.). Se sólo es necesario que el procedimiento de ingeniería genética particular utilizado sea capaz de introducir con éxito al menos un gen en la célula huésped capaz de expresar la proteína de elección.

VIII. ENSAYOS

Una vez que la ZFP se ha diseñado y preparado de acuerdo con los procedimientos establecidos simplemente, se lleva a cabo una evaluación inicial de la actividad de la ZFP de diseño. Proteínas de ZFP que muestran la capacidad de modular la expresión de un gen de interés entonces se pueden ensayar adicionalmente para actividades más específicas dependiendo de la aplicación particular para la que el ZFP han sido diseñados. Así, por ejemplo, las ZFP proporcionados en el presente documento se pueden ensayar inicialmente por su capacidad para modular la expresión de PLN. Ensayos más específicos de la capacidad de la ZFP para modular la expresión del gen diana PLN para tratar las enfermedades del corazón (s) A continuación, se realizan normalmente. Una descripción de estos ensayos más específicos se exponen más adelante en la sección IX.

La actividad de una ZFP particular puede evaluarse utilizando una variedad de *in vitro* e *in vivo*, mediante la medición, por ejemplo, los niveles de proteína o ARNm, niveles de producto, actividad enzimática, el crecimiento del tumor; activación o represión transcripcional de un gen reportero; niveles de segundos mensajeros (por ejemplo, el cGMP, cAMP, IP3, DAG, Ca²⁺ +); los niveles de citoquinas y la producción de hormonas; y neovascularización, utilizando, por ejemplo, inmunoensayos (por ejemplo, ELISA y ensayos inmunohistoquímicos con anticuerpos),

ensayos de hibridación (por ejemplo, protección de RNasa, Northern, hibridación in situ, estudios de matriz de oligonucleótidos), ensayos colorimétricos, ensayos de amplificación, ensayos de actividad enzimática, crecimiento tumoral ensayos, ensayos fenotípicos, y similares.

- 5 Las ZFP normalmente se analizan primero para determinar la actividad in vitro utilizando células cultivadas, por ejemplo, células 293, células CHO, células VERO, células BHK, células HeLa, células COS, y similares. Preferiblemente, las células humanas se utilizan. La ZFP es a menudo primera prueba utilizando un sistema de expresión transitorio con un gen informador, y luego la regulación del gen endógeno diana se prueba en las células y en animales, tanto in vivo como ex vivo. La ZFP puede expresarse recombinantemente en una célula, de forma recombinante expresado en células trasplantadas en un animal, o expresado de forma recombinante en un animal transgénico, así como administrarse como una proteína a un animal o de células utilizando vehículos de suministro descritos a continuación. Las células pueden ser inmovilizadas, estar en solución, inyectarse en un animal, o ser de origen natural en un animal transgénico o no transgénico.
- 10
- 15 La modulación de la expresión génica se ensaya utilizando uno de los in vitro o ensayos in vivo descritos en el presente documento. Las muestras o ensayos se tratan con una ZFP y en comparación con muestras de control no tratadas, para examinar el grado de modulación. Como se describió anteriormente, para la regulación de la expresión del gen endógeno, la ZFP tiene típicamente una Kd de 200 nM o menos, más preferiblemente 100 nM o menos, más preferiblemente 50 nM, más preferiblemente 25 nM o menos.
- 20
- 25 Los efectos de las ZFP pueden medirse mediante el examen de cualquiera de los parámetros descritos anteriormente. Cualquier expresión génica, fenotípico o cambio fisiológico adecuado se pueden utilizar para evaluar la influencia de una ZFP. Cuando las consecuencias funcionales se determinan usando células o animales intactos, también se puede medir una variedad de efectos tales como la compartimentación de calcio intracelular, la contractilidad celular, los cambios transcripcionales a ambos marcadores genéticos conocidos y no caracterizados (por ejemplo, transferencias Northern o estudios de matriz de oligonucleótidos), cambios en el metabolismo celular tales como crecimiento celular o cambios de pH, y los cambios en segundos mensajeros intracelular tales como campamento o cGMP.
- 30
- 35 Los ensayos preferidos para la regulación por ZFP de la expresión de gen endógeno se pueden realizar in vitro. En un formato de ensayo preferido in vitro, la regulación por ZFP de la expresión de gen endógeno en células cultivadas se mide mediante el examen de la producción de proteína utilizando un ensayo ELISA. La muestra de ensayo se compara con células de control tratadas con un vector que carece de secuencias que codifican ZFP o un vector que codifica una ZFP no relacionada que está dirigida a otro gen.
- 40
- 45 En otra realización, la regulación por ZFP de la expresión de gen endógeno se determina in vitro mediante la medición del nivel de gen expresión de ARNm (por ejemplo, nivel de expresión del gen PLN objetivo). El nivel de expresión génica se mide utilizando amplificación, por ejemplo, utilizando PCR, LCR, o ensayos de hibridación, por ejemplo, hibridación Northern, transferencia puntual y protección de RNasa. El uso de técnicas de RT-PCR cuantitativa (es decir, los llamados TaqMan ® ensayos) también puede ser utilizado para cuantificar el nivel de transcripción. El nivel de proteína o ARNm se detecta utilizando agentes de detección marcado directa o indirectamente, por ejemplo, con fluorescencia o marcado radiactivamente ácidos nucleicos, anticuerpos marcados radiactivamente o enzimáticamente, y similares, como se describe en el presente documento. Estos métodos también se describen en los Estados Unidos Patnos. 5.210.015 a Gelfand, la patente de EE.UU. Nº 5.538.848 de Livak, et al., y la patente de EE.UU. Nº 5.863.736 de Haaland, así como Heid, CA, et al, Genome Research, 6: 986-994 (1996); Gibson, UE M, et al, Genome Research 6: 995-1001 (1996); Holanda, PM, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 88: 7.276-7.280, (1991); y Livak, KJ, et al., PCR Methods and Applications 357-362 (1995).
- 50 Alternativamente, un sistema de gen indicador se puede diseñar utilizando un promotor del gen del gen diana seleccionada (por ejemplo, PLN) unido operativamente a un gen informador tal como luciferasa, proteína fluorescente verde, CAT, GAPDH, β -gal, etc. La construcción indicadora se co-transfecta normalmente en una célula cultivada. Después del tratamiento con la ZFP de elección, la cantidad de transcripción del gen reportero, traducción, o actividad se mide de acuerdo con técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica.
- 55 Otro ejemplo de un formato de ensayo preferido útil para la regulación de monitoreo ZFP de la expresión de gen endógeno se lleva a cabo in vivo. Este ensayo es particularmente útil para examinar los genes implicados en la contractilidad. En este ensayo, la ZFP de elección se administra (por ejemplo, intramuscular o inyección intracardiaca) en un animal que exhibe la función aberrante cardíaca (por ejemplo, la contractilidad aberrante). Después de un periodo de tiempo adecuado, preferiblemente de 4-8 semanas, la función del corazón y / o la expresión de genes se comparan con los animales control que también tienen la contractilidad aberrante pero no recibieron una ZFP. La contractilidad que es significativamente diferente entre los animales control y de prueba (utilizando, por ejemplo, la prueba t de Student) se dice que se han visto afectados por la ZFP.
- 60

IX. COMPOSICIONES farmacéuticas

Las ZFP proporcionadas en el presente documento, y más típicamente los ácidos nucleicos que los codifican, opcionalmente se puede formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable como una composición farmacéutica.

A. COMPOSICIONES BASADAS EN ÁCIDOS NUCLEICOS

Se pueden usar métodos de transferencia de genes convencionales virales y no virales basados se pueden utilizar para introducir ácidos nucleicos que codifican las presentes ZFP en células de mamífero o los tejidos diana. Tales métodos se pueden utilizar para administrar ácidos nucleicos que codifican ZFP a células in vitro. En algunos casos, los ácidos nucleicos que codifican ZFP se administran in vivo o ex vivo usos de terapia génica. Los sistemas de suministro de vectores no víricos incluyen plásmidos de ADN, ácido nucleico desnudo, y el ácido nucleico complejo con un vehículo de suministro tal como poloxámeros o liposomas. Sistemas de suministro de vector viral incluyen virus ADN y ARN, que tienen ya sea episomal o genomas integrados después de suministro a la célula. Para una revisión de procedimientos de terapia génica, véase Anderson, *Science* 256: 808-813 (1992); Nabel y Felgner, *TIBTECH* 11: 211-217 (1993); Mitani y Caskey, *TIBTECH* 11: 162-166 (1993); Dillon, *TIBTECH* 11: 167-175 (1993); Miller, *Nature* 357: 455-460 (1992); Van Brunt, *Biotechnology* 6 (10): 1149-1154 (1988); Vigne, *Restaurativa Neurología y Neurociencia* 8: 35-36 (1995); Kremer y Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51 (I): 31-44 (1995); Haddada et al, en *Temas actuales en Microbiología e Inmunología Doerfler y Bohm (eds)* (1995).; y Yu et al, *Gene Therapy* 1: 13-26 (1994).

Los métodos de liberación no viral de ácidos nucleicos que codifican las ZFP proporcionadas en el presente documento incluyen lipofección, microinyección, biolística, virosomas, liposomas, inmunoliposomas, policación o lípido: ácido nucleico conjugados, ADN desnudo, viriones artificiales, y la absorción de agente mejorada de ADN. La lipofección se describe en, por ejemplo, US Pat. Nos. 5.049.386, 4.946.787; y 4.897.355) y reactivos de lipofección se venden comercialmente (por ejemplo, TransfectamTM y lipofectinaTM). Los lípidos catiónicos y neutros que son adecuados para lipofección eficiente de reconocimiento de receptores de polinucleótidos incluyen los de Felgner, WO 91/17424, WO 91/16024. La liberación puede ser a las células (administración ex vivo) o a tejidos diana (administración in vivo).

La preparación de complejos de lípido: ácido nucleico, incluyendo liposomas dirigidos tales como complejos de inmunolípido, es bien conocido para un experto en la técnica (ver, por ejemplo, , Crystal, *Science* 270: 404-410 (1995); Blaese et al, *Cancer Gene Ther* 2: 291-297 (1995); Behr et al, *Bioconjugate Chem.* 5: 382-389 (1994); Remy et al, *Bioconjugate Chem* 5: 647-654 (1994); Gao et al, *Gene Therapy* 2: 710-722 (1995); Ahmad et al, *Cancer Res.* 52: 4817-4820 (1992); la Patente de EE.UU. . Nos. 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028, y 4.946.787).

El uso de sistemas basados en virus de ARN o ADN para la liberación de ácidos nucleicos que codifican ZFP ingeniería tomar ventaja de los procesos altamente evolucionados para dirigir un virus a las células específicas en el cuerpo y el tráfico de la carga viral al núcleo. Los vectores víricos pueden administrarse directamente a los pacientes (in vivo) o pueden usarse para tratar células in vitro y las células modificadas se administran a los pacientes (ex vivo). Los sistemas convencionales basados en virus para la entrega de ZFP pueden incluir retroviral, lentivirus, , vectores adeno-asociados y virus del herpes simple adenovirales para la transferencia génica. Los vectores víricos son actualmente el método más eficiente y versátil de transferencia génica en células y tejidos diana. La integración en el genoma anfitrión es posible con el retrovirus, lentivirus, y los métodos de transferencia de genes de virus adeno-asociados, a menudo resulta en la expresión a largo plazo del transgén insertado. Además, altas eficiencias de transducción se han observado en muchos tipos de células y tejidos diana diferentes.

El tropismo de un retrovirus puede alterarse por incorporación de proteínas de la envoltura exterior, la expansión de la población diana potencial de células diana. Los vectores lentivirales son vector retroviral que son capaces de transducir o infectar células que no se dividen y producen típicamente títulos virales elevados. Por lo tanto, la selección de un sistema de transferencia génica retroviral puede depender en el tejido diana. Los vectores retrovirales están compuestos de cis-actuando repeticiones terminales largas con capacidad de envasado para un máximo de 6 a 10 kb de secuencia extraña. Las LTR mínimas de acción cis son suficientes para replicación y empaquetamiento de los vectores, que luego se utilizan para integrar el gen terapéutico en la célula diana para proporcionar la expresión del transgen permanente. Ampliamente utilizan vectores retrovirales incluyen los basados en virus de la leucemia murina (MuLV), la leucemia del mono gibbon virus (GaLV), virus de la inmunodeficiencia del simio (SIN), virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), y combinaciones de los mismos (ver, por ejemplo, Buchscher et al ., *J. Virol* 66: 2731-2739 (1992);. Johann et al, *J. Virol* 66: 1635-1640 (1992); Sommerfelt et al, *Virol* 176: 58-59 (1990); Wilson et al, *J. Virol* 63: 2374-2378 (1989); Miller et al, *J. Virol.* 65: 2220-2224 (1991); PCT / US94 / 05700).

En aplicaciones en las que la expresión transitoria de la ZFP se prefiere, se utilizan típicamente sistemas basados en adenovirus. Los vectores basados en adenovirus son capaces de muy alta eficiencia de transducción en muchos tipos de células y no requieren de la división celular. Con tales vectores, se han obtenido alto título y los niveles de

expresión. Este vector puede producirse en grandes cantidades en un sistema relativamente simple. Los vectores de virus adenoasociados ("AAV") también se usan para transducir células con ácidos nucleicos diana, por ejemplo, en la producción in vitro de ácidos nucleicos y péptidos, y para in vivo y ex vivo procedimientos de terapia génica (véase, por ejemplo, West et al, *Virology* 160: 38-47 (1987); Patente de Estados Unidos No. 4.797.368; WO 93/24641; Kotin, *Human Gene Therapy* 5: 793-801 (1994); Muzyczka, *J. Clin Invest* 94: 1351 (1994) Construcción de vectores AAV recombinantes se describe en una serie de publicaciones, incluyendo la Patente de EE.UU. No. 5.173.414; Tratschin et al, *Mol Cell Biol* 5: 3251 a 3260 (1985); Tratschin, et al., *Mol Cell Biol* 4: 2072-2081 (1984); Hermonat y Muzyczka, *PNAS* 81:6466 - 6.470 (1984); y Samulski et al, *J. Virol* 63: 03822-3828 (1989).. Véase, por ejemplo, los Ejemplos 1.

En particular, al menos seis enfoques de vectores virales Actualmente disponible para la transferencia de genes en los ensayos clínicos, con vectores retrovirales, con mucho, el sistema más utilizado. Todos estos vectores virales utilizan enfoques que implican complementación de vectores defectuosos . por genes insertados en líneas de células cooperadoras para generar el agente de transducción.

pLASN y MFG-S son ejemplos de vectores retrovirales que se han utilizado en los ensayos clínicos (Dunbar et al, *Blood* 85: 3048-305 (1995); Kohn et al., *Nat. Med.* 1: 1017-102 (1995); Malech et al., *PNAS* 94:22 12133 a 12138 (1997)). PA317 / pLASN fue el primer vector terapéutico utilizado en un ensayo de terapia génica. (Blaese et al, *Science* 270: 475-480 (1995)). Las eficacias de transducción de 50% o mayor se han observado para MFG-S vectores empaquetados. (Ellem et al, *Immunol Immunother* 44 (1): 10-20 (1997); Dranoff et al, *Hum Gene Ther* 1: 111-2 (1997).

Los vectores de virus adenoasociados recombinantes (rAAV) constituyen otro sistemas de liberación de genes alternativos basados en el virus adenoasociado parvovirus defectuoso y no patogénico de tipo 2. Todos los vectores se derivan de un plásmido que retiene solamente las AAV 145 bp repeticiones terminales invertidas que flanquean el casete de expresión del transgén. transferencia génica eficiente y suministro de transgenes estable debido a la integración en los genomas de la célula transducida son características clave para este sistema vector (Wagner et al, *Lancet* 351: 9117 1702-3 (1998), Kearns et al, *Gene Ther* 9: 748-55 (1996)).

Los vectores adenovirales recombinantes de replicación deficiente (AD) se utilizan predominantemente para terapia génica del cáncer de colon, debido a que se pueden producir a título elevado y se infectan fácilmente un número de diferentes tipos de células. La mayoría de los vectores de adenovirus están diseñados de tal manera que un transgén reemplaza el Ad Ela, Elb, y E3 genes; posteriormente el desertor vector de replicación se propaga en células humanas 293 que suministran eliminan la función de genes en trans. Vectores de Ad pueden transducir tipos multiplican de tejidos in vivo, incluyendo que no se dividen, las células diferenciadas tales como las que se encuentran en los tejidos de hígado, riñón y sistema muscular. Vectores de anuncios convencionales tienen una gran capacidad de carga. Un ejemplo del uso de un vector Ad en una prueba clínica de terapia involucrado polinucleótido para la inmunización antitumoral con inyección intramuscular (Stermen et al, *Hum Gene Ther* 7: 1083-9 (1998)). Los ejemplos adicionales de la utilización de vectores de adenovirus para la transferencia génica en ensayos clínicos incluyen Rosenecker et al, 24 *Infección*: 05 al 10 01 (1996); Stermen et al., *Hum. Gene Ther.* 9: 7 1083-1089 (1998); Gales et al., *Hum. Gene Ther.* 2: 205-18 (1995); Alvarez et al., *Hum. Gene Ther.* 5: 597-613 (1997); TOPFET al, *Gene Ther.* 5: 507-513 (1998); Stermen et al., *Hum. Gene Ther.* 7: 1083-1089 (1998).

Las células de empaquetamiento se utilizan para formar partículas de virus que son capaces de infectar una célula huésped. Tales células incluyen células 293, que paquete de adenovirus, y .psi.2 células o células PA317, que paquete de retrovirus. Los vectores víricos utilizados en terapia génica normalmente se generan por la línea celular productora que empaqueta un vector de ácido nucleico en una partícula viral. Los vectores contienen típicamente las secuencias víricas necesarias mínimas para el empaquetamiento y la integración posterior en un huésped, otras secuencias virales se reemplazan por un casete de expresión para la proteína a ser expresada. Las funciones víricas ausentes son suministradas en trans por la línea celular de empaquetamiento. Por ejemplo, los vectores AAV utilizados en terapia génica poseen típicamente sólo secuencias ITR del genoma de AAV que se requieren para el empaquetamiento y la integración en el genoma del huésped. El ADN viral se empaqueta en una línea celular, que contiene un plásmido auxiliar que codifica los otros genes de AAV, a saber rep y cap, pero que carece de secuencias ITR. La línea celular también está infectada con el adenovirus como ayudante. El virus auxiliar promueve la replicación del vector AAV y la expresión de genes de AAV a partir del plásmido ayudante. El plásmido auxiliar no se empaqueta en cantidades significativas debido a una carencia de secuencias ITR. La contaminación con adenovirus puede reducirse mediante, por ejemplo, tratamiento térmico al que adenovirus es más sensible que AAV.

Como se ha indicado anteriormente, varios vehículos de entrega virales, como son conocidos en la técnica, se puede utilizar para introducir un ácido nucleico (por ejemplo, un nucleico ácido que codifica una proteína de dedos de cinc) en una célula. La elección del vehículo de entrega depende de un número de factores, incluyendo pero no limitado a, el tamaño del ácido nucleico a liberar y la célula diana deseada.

En ciertas realizaciones, los adenovirus se usan como vehículos de suministro. adenovirus vehículos ejemplares incluyen adenovirus 2 Tipos , 5, 12 y 35. Por ejemplo, los vehículos útiles para la introducción de transgenes en células madre hematopoyéticas, por ejemplo, CD34 + células, incluyen adenovirus de tipo 35. vehículos

adenovirales adicionales incluyen los llamados adenovirus "gutless". Véase, por ejemplo, Kochanek et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. . USA 93: 5,731-5,736.

Se han descrito vehículos de virus adeno-asociados AAV incluyen los serotipos 1, 2, 5, 6, 7, 8 y 9; así como los serotipos de AAV quiméricos, por ejemplo, AAV 2/1 y AAV 2/5. Se pueden usar los vectores AAV de tanto mono como bicatenarios.

Se han descrito vehículos de liberación en lentivirus vehículos en, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. 6.312.682 y 6.669.936 y en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2002/0173030 y se puede utilizar, por ejemplo, para introducir transgenes en células inmunes (por ejemplo, células T). Los lentivirus son capaces de integrar una copia de ADN de su genoma de ARN en el genoma de una célula huésped. Véase, por ejemplo, Ory et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. c / 4 y 93: 11.382 a 11388; Miyoshi et al. (1998) J. Virology 72: desde 8150 hasta 8157; Dull et al. (1998) J. Virol. 72: 8463 a 8.471; Zuffery et al. (1998) J. Virol. 72: 9873 hasta 9880; Follenzi et al. (2000) Nature Genetics 25: 217-222 y Delenda (2004) J. Gen Medicina 6: S125-S138. En determinados vehículos lentiviral, esta función de integración se ha deshabilitado para generar no integren vehículos lentivirus. Véase, por ejemplo, Poon et al. (2003) J. Virology 77: 3962-3972 y Vargas et al. (2004) Human Gene Therapy 15: 361-372. El uso tanto de la integración y no la integración de vectores de lentivirus para la transducción de células madre hematopoyéticas ha sido descrito por Haas et al. (2000) Mol. Terapia 2: 71-80. Transducción de CD4 + células T con la integración de vectores lentivirus ha sido descrito por Humeau et al. (2004) Mol. Terapia 9: 902-913.

Se han descrito vehículos del virus del herpes simple que son capaces de la expresión a largo plazo en las neuronas y ganglios. Véase, por ejemplo, Krisky et al. (1998) Terapia Génica 5 (11): 1517-1530; Krisky et al. (1998) Terapia Génica 5 (12): 1593-1603; Burton et al. (2001) Células madre 19: 358-377; Lilley et al. (2001) J. Virology 75 (9): 4343 a 4356 .

Métodos para mejorar la eficiencia de la transducción retroviral de células madre hematopoyéticas se describen, por ejemplo, en la Patente US No. 5.928.638.

El tropismo de vehículos de reparto retrovirales y lentivirales puede ser alterado por el proceso de pseudotipado, permitiendo así la entrega viral de un ácido nucleico a un tipo celular particular. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 5.817.491.

En muchas aplicaciones de terapia génica, es deseable que el vector de terapia génica pueda liberar con un alto grado de especificidad para un tipo de tejido particular. Un vector viral es modificada típicamente para tener especificidad para un tipo de célula dado por expresión de un ligando como una proteína de fusión con una proteína de la cubierta viral en los virus superficie exterior. El ligando se elige para tener afinidad por un receptor sabe que está presente en el tipo celular de interés. Por ejemplo, Han et al, PNAS 92: 9747-9751 (1995), informó de que virus de leucemia murina de Moloney puede modificarse para expresar la herregulina humana fusionada a gp70, y el virus recombinante infecta ciertas células de cáncer de mama humano que expresa el factor de crecimiento epidérmico humano receptor. Este principio puede extenderse a otros pares de virus que expresan una proteína de fusión de células diana que expresan ligando y un receptor. Por ejemplo, fago filamentoso puede diseñarse para mostrar fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab o Fv) que tienen afinidad de unión específica para virtualmente cualquier receptor celular seleccionado. Aunque la descripción anterior se aplica fundamentalmente a vectores víricos, los mismos principios pueden aplicarse a vectores no virales. Tales vectores pueden ser diseñados para contener secuencias de absorción específicas que se cree favorecen la absorción por células diana específicas.

Los vectores de terapia génica pueden administrarse in vivo mediante la administración a un paciente individual, típicamente por administración sistémica (por ejemplo, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subdérmica, o infusión intracraneal) o aplicación tópica, como se describe a continuación. Alternativamente, los vectores pueden administrarse a células ex vivo, tales como células explantadas de un paciente individual (por ejemplo, linfocitos, aspirados de médula ósea, biopsia de tejidos) o células madre hematopoyéticas donantes universales, seguido de reimplante de las células en un paciente, usualmente después de la selección de células que han incorporado el vector.

La transfección ex vivo de células para el diagnóstico, investigación, o para terapia génica (por ejemplo, a través de re-infusión de las células transfectadas en el organismo hospedador) es bien conocida por los expertos en la técnica. En algunos casos, las células se aíslan del organismo del sujeto, transfectadas con un ácido nucleico de ZFP (gen o ADNc), y re-infundidas de nuevo en el organismo sujeto (por ejemplo, paciente). Diversos tipos de células adecuadas para transfección ex vivo son bien conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Freshney et al., Culture of Animal Cells, A Manual de la Técnica básica (3rd ed. 1994)) y las referencias que allí se cita para una discusión de cómo aislar y cultivar células de pacientes).

En una realización, las células madre se usan en procedimientos ex vivo para transfección celular y terapia génica. La ventaja de usar células madre es que pueden diferenciarse en otros tipos de células in vitro, o pueden introducirse en un mamífero (tal como el donante de las células) donde van a injertarse en la médula ósea. Los métodos para diferenciar células CD34 + in vitro en clínicamente importantes tipos de células inmunes usando

citoquinas un GM-CSF tal, IFN- γ y TNF- α se conocen (véase Inaba et al, J. Exp Med 176: 1693-1702 (1992)).

Las células madre se aíslan para transducción y diferenciación utilizando métodos conocidos. Por ejemplo, las células madre se aíslan de células de médula ósea mediante selección de las células de la médula ósea con anticuerpos que se unen a las células no deseadas, tales como CD4 + y CD8 + (células T), CD45 + (células panB), GR-1 (granulocitos), y lad (antígeno de células presentadoras diferenciada) (véase Inaba et al, J. Exp Med 176: 1693-1702 (1992)).

Los vectores (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, liposomas, etc.) que contienen ácidos nucleicos terapéuticos de ZFP pueden administrarse directamente al organismo para transducción de células in vivo. Alternativamente, el ADN desnudo puede ser administrado. La administración es mediante cualquiera de las rutas utilizadas normalmente para introducir una molécula en contacto íntimo con sangre o tejidos celulares. Los métodos adecuados de administración de tales ácidos nucleicos están disponibles y bien conocidos por los expertos en la técnica, y, aunque más de una ruta puede utilizarse para administrar una composición particular, una ruta en particular puede a menudo proporcionar una reacción más inmediata y más eficaz que otra ruta.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el método particular usado para administrar la composición. En consecuencia, existe una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas, como se describe a continuación (véase, por ejemplo, Pharmaceutical Sciences de Remington, 17ª ed., 1989).

B. COMPOSICIONES PROTEICAS

Un factor importante en la administración de compuestos polipeptídicos, tales como las presentes ZFP, es asegurarse de que el polipéptido tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática de una célula, o la membrana de un compartimento-intracelular tal como el núcleo. Las membranas celulares están compuestas de bicapas de lípido-proteína que son libremente permeables a pequeños compuestos lipófilos no iónicos, y son inherentemente impermeables a compuestos polares, macromoléculas, y agentes terapéuticos o de diagnóstico. Sin embargo, las proteínas y otros compuestos tales como liposomas se han descrito, que tienen la capacidad de trasladar polipéptidos tales como ZFP a través de una membrana celular.

Por ejemplo, los "polipéptidos de translocación de membrana" tienen subsecuencias de aminoácidos anfífilos o hidrófobos que tienen la capacidad de actuar como transportadores de translocación transmembrana. En una realización, las proteínas de homeodominio tienen la capacidad de trasladar a través de las membranas celulares. El péptido internalizable más corto de una proteína de homeodominio, Antennapedia, se encontró que era la tercera hélice de la proteína, desde la posición de aminoácido 43 a 58 (véase, por ejemplo, Prochiantz, Current Opinion in Neurobiología 6: 629-634 (1996)). Otra subsecuencia, el h (hidrófobo) de dominio de los péptidos señal, se encontró que tenía translocación de membrana de células similares características (véase, por ejemplo, Lin et al, J. Biol Chem. 270: 14255 a 14.258.. (1995)).

Ejemplos de secuencias de péptidos que pueden ser vinculados a una ZFP, para facilitar la absorción de ZFP en las células, incluyen, pero no se limitan a: un péptido de 11 aminoácidos de la proteína tat de HJN; una secuencia peptídica de 20 residuos que corresponde a los aminoácidos 84 a 103 de la proteína pi 6 (véase Fahraeus et al, Current Biology 6:84 (1996).); la tercera hélice del homeodominio largo de 60 aminoácidos de Antennapedia (Derossi et al, J. Biol Chem 269: 10444 (1994)...); la región h de un péptido señal tal como el factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi (K-FGF) h región (Lin et al., supra); o la VP22 dominio de translocación de HSV (Elliot y O'Hare, Cell 88: 223-233 (1997)). Otros restos químicos adecuados que proporcionan absorción celular mejorada también se pueden enlazar químicamente a ZFP. Dominios de translocación de membrana (es decir, dominios de internalización) también se pueden seleccionar a partir de bibliotecas de secuencias de péptidos aleatorios. Véase, por ejemplo, Yeh et al. (2003) Molecular Terapia 7 (5): S461., Abstract # 1191.

Las moléculas de toxina también tienen la capacidad de transportar polipéptidos a través de membranas celulares. A menudo, tales moléculas están compuestas por al menos dos partes (llamadas "toxinas binarias"): una translocación o dominio de unión o polipéptido y un dominio de toxina separado o polipéptido. Típicamente, el dominio de translocación o polipéptido se une a un receptor celular, y después la toxina se transporta en la célula. Varias toxinas bacterianas, incluyendo la toxina de Clostridium perfringens iota, toxina de la difteria (DT), exotoxina A de Pseudomonas (PE), la toxina pertussis (PT), la toxina de Bacillus anthracis, y la adenilato ciclasa pertussis (CYA), han sido utilizadas en intentos para entregar a péptidos el citosol celular como fusiones internas o amino-terminal (Arora et al, J. Biol Chem, 268: 3.334 a 3.341 (1993); Perelle et al, Infect Immun, 61: . 5147-5156 (1993); Stemnark et al, J. Cell Biol 113: 1025-1032 (1991); Donnelly et al, PNAS 90: 3530 - 3534 (1993); Carbonetti et al, Abstr Annu Meet Am Soc Microbiol . 95: 295 (1995); Sebo et al, Infect Immun 63: 3.851 hasta 3.857 (1995); Klimpel et al, PNAS EE.UU. 89: 10277 a 10281 (1992); y Novak et al, J. Biol Chem 267: 17.186 a 17193 (1992)).

Tales subsecuencias se pueden utilizar para trasladar ZFP a través de una membrana celular. ZFP puede ser convenientemente fusionado a o derivatizarse con dichas secuencias. Típicamente, la secuencia de translocación se proporciona como parte de una proteína de fusión. Opcionalmente, un enlazador puede ser utilizada para vincular la

ZFP y la secuencia de translocación. Cualquier conector adecuado se puede utilizar, por ejemplo, un conector peptídico.

La ZFP puede introducirse también en una célula animal, preferiblemente una célula de mamífero, a través de un liposomas y derivados de liposomas tales como inmunoliposomas. El término "liposoma" se refiere a vesículas que comprenden una o más bicapas lipídicas ordenadas concéntricamente, que encapsulan una fase acuosa. La fase acuosa contiene típicamente el compuesto a suministrar a la célula, es decir, una ZFP. El liposoma se fusiona con la membrana plasmática, liberando con ello el fármaco en el citosol. Alternativamente, el liposoma es fagocitado o absorbido por la célula en una vesícula de transporte. Una vez en el endosoma o fagosoma, el liposoma se degrada o bien se fusiona con la membrana de la vesícula de transporte y libera su contenido.

En los métodos actuales de liberación de fármacos mediante liposomas, el liposoma en última instancia se hace permeable y libera el compuesto encapsulado (en este caso, una ZFP) en el tejido o célula diana. Para la entrega sistémica específica o tejida, esto se puede lograr, por ejemplo, de una manera pasiva donde la bicapa del liposoma se degrada con el tiempo a través de la acción de diversos agentes en el cuerpo. Alternativamente, la liberación del fármaco activo implica el uso de un agente para inducir un cambio de permeabilidad en la vesícula del liposoma. Membranas de los liposomas pueden ser construidos de manera que desestabilizarse cuando el entorno se vuelve ácido cerca de la membrana del liposoma (véase, por ejemplo, PNAS 84: 7851 (1987); Biochemistry 28: 908 (1989)). Cuando los liposomas se endocitos por una célula diana, por ejemplo, se convierten en desestabilizado y liberan sus contenidos. Esta desestabilización se denomina fusogénesis. dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) es la base de muchos sistemas "fusogénicos".

Tales liposomas comprenden típicamente una ZFP y un componente lipídico, por ejemplo, un lípido neutro o catiónico y, incluyendo opcionalmente una molécula de reconocimiento de receptores tal como un anticuerpo que se une a un receptor predeterminado de la superficie celular o ligando (por ejemplo, un antígeno). Una variedad de métodos están disponibles para preparar liposomas como se describe en, por ejemplo, Szoka et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), US Pat. Nos. 4.186.183, 4.217.344, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028, 4.235.871, 4.261.975, 4.485.054, 4.501.728, 4.774.085, 4.837.028, 4.946.787, Publicación PCT No. WO 91. backlash.17424, Deamer y Bangham, Biochim. Biophys. Acta 443: 629-634 (1976); Fraley, et al, PNAS. 76: 3.348-3.352 (1979); Hope et al., Biochim. Biophys. Acta 812: 55-65 (1985); Mayer et al., Biochim. Biophys. Acta 858: 161-168 (1986); Williams et al, PNAS 85: 242-246 (1988); Los liposomas (Ostro (ed), 1983, Capítulo 1.); Hope et al., Chem. Phys. Lip. 40:89 (1986); Gregoriadis, tecnología de liposomas (1984) y Lasic, liposomas: desde la física a Aplicaciones (1993)). Los métodos adecuados incluyen, por ejemplo, sonicación, extrusión, alta presión / homogenización, microfluidización, diálisis con detergente, fusión inducida por calcio de pequeñas vesículas de liposomas y métodos éter de fusión, todos los cuales son bien conocidos en la técnica.

En algunos casos, los liposomas están dirigidos utilizando restos de direccionamiento que son específicos para un tipo particular de células, tejidos, y similares. Orientación de los liposomas usando una variedad de restos de direccionamiento (por ejemplo, ligandos, receptores, y anticuerpos monoclonales) ha sido descrito previamente (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. Nos. 4.957.773. Y 4.603.044).

Los métodos estándar para acoplamiento de agentes de direccionamiento a liposomas se puede utilizar. Estos métodos implican generalmente la incorporación en componentes lipídicos de liposomas, por ejemplo, fosfatidiletanolamina, que pueden ser activadas para la fijación de agentes de direccionamiento, o compuestos lipófilos derivatizados, tales como bleomicina lípido derivado. Anticuerpo dirigido liposomas se pueden construir usando, por ejemplo, liposomas que incorporan proteína A (véase Renneisen et al, J. Biol Chem., 265: 16337 a 16342 (1990) y Leonetti et al, PNAS 87: 2448-2451 (1990).

C. DOSIFICACIÓN

Para aplicaciones terapéuticas de ZFP, la dosis administrada a un paciente debería ser suficiente para afectar a una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente con el tiempo. La dosis se determinará por la eficacia y la Kd de la ZFP particular empleada, el volumen nuclear de la célula diana, y la condición del paciente, así como el peso corporal o área de superficie de la paciente a tratar. El tamaño de la dosis también será determinado por la existencia, naturaleza y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañan la administración de un compuesto particular o vector en un paciente particular.

En la determinación de la cantidad eficaz de la ZFP a administrar en el tratamiento o profilaxis de enfermedades del corazón, el médico evalúa los niveles circulantes en plasma de la ZFP o del ácido nucleico que codifica la ZFP, las toxicidades potenciales de ZFP, la progresión de la enfermedad, y la producción de anticuerpos anti-ZFP. La administración puede llevarse a cabo a través de dosis únicas o divididas.

D. COMPOSICIONES Y MODOS DE ADMINISTRACIÓN

1. GENERAL

- 5 Las ZFP y los ácidos nucleicos que codifican las ZFP pueden administrarse directamente a un sujeto (por ejemplo, paciente) para la modulación de la expresión génica y para aplicaciones terapéuticas o profilácticas. En general, y en vista de la discusión en el presente documento, las frases se refieren a la introducción de una ZFP en un animal o paciente pueden significar que se introduce una proteína ZFP o fusión ZFP y / o que un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de ZFP o ZFP se introduce en una forma que puede ser expresado en el animal. Por ejemplo, como se describe en mayor detalle en la siguiente sección, la ZFP y / o ácidos nucleicos puede ser utilizado en el tratamiento de una o más enfermedades del corazón.

- 15 La administración de cantidades terapéuticamente eficaces es por cualquiera de las rutas utilizadas normalmente para introducir ZFP en contacto final con el tejido a tratar. El ZFP se administran de cualquier manera adecuada, preferiblemente con vehículos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, poloxámero y o tampón). Los métodos adecuados de administración de tales moduladores están disponibles y bien conocidos por los expertos en la técnica, y, aunque más de una ruta puede utilizarse para administrar una composición particular, una ruta en particular puede a menudo proporcionar una reacción más inmediata y más efectiva que otra ruta.

- 20 Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administra, así como por el método particular usado para administrar la composición. En consecuencia, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas (véase, por ejemplo, Remington Pharmaceutical Sciences, 17a ed. 1985)).

- 25 Las ZFP, solas o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden hacer en formulaciones en aerosol (es decir, se pueden "nebulizar") para su administración mediante inhalación. Las formulaciones en aerosol se pueden introducir en propelentes presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

- 30 Formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intradérmica y subcutánea, incluyen acuosa y no acuosa, soluciones de inyección estéril isotónicas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, y acuosa y no acuosa suspensiones estériles que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. En la práctica de los métodos descritos, las composiciones se pueden administrar, por ejemplo, por infusión intravenosa, oral, tópica, intraperitoneal, intravesical o intratecal. Las formulaciones de compuestos pueden presentarse en dosis unitarias o recipientes multidosis sellados, tales como ampollas y viales. Soluciones y suspensiones para inyección se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente.

40 2. OPCIONES DE LIBERACIÓN DE EJEMPLO

- Se dispone de diversas opciones para la liberación de las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento con el fin de modular la expresión PLN. Dependiendo de la indicación particular (por ejemplo, insuficiencia cardíaca), las composiciones pueden ser dirigidos a áreas o tejidos de un sujeto específico. Por ejemplo, en algunos métodos, uno de ellos responde composiciones a regiones específicas del corazón para tratar la insuficiencia cardíaca congestiva. Otros tratamientos, por el contrario, implican la administración de la composición de manera general sin tratar de dirigir la administración a regiones específicas.

- Se puede usar una serie de abordajes para localizar la liberación de agentes en regiones particulares. Algunos de estos métodos implican la entrega a la luz del cuerpo o a un tejido (véase, por ejemplo, las patentes US nº 5.941.868;... 6.067.988; 6.050.986; y 5.997.509; así como las publicaciones PCT WO 00/25850; WO 00/04928; 99 / 59666; y 99/38559). La liberación también puede efectuarse mediante inyección o administración intramiocárdica. Ejemplos de tales abordajes incluyen los discutidos en las patentes de EE.UU. Nº 6.086.582; 6.045.565; 6.056.969; y 5.997.525; y en las publicaciones PCT WO 00/16848; WO 00/18462; WO 00/24452; WO 99/49773 y WO 99/49926. Otras opciones de liberación local incluyen la inyección intrapericárdica (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.931.810;... 5.968.010 y 5.972.013) y la liberación perivascular. También se pueden usar varios revascularizar abordajes de liberación por canal revascular transmiodiárdico (TMR). Muchos de estos métodos utilizan un láser para realizar la revascularización. Una discusión de estos enfoques se expone en la Patente de Estados Unidos. Nos. 5.925.012; 5.976.164; 5.993.443; y 5.999.678, por ejemplo. Otras opciones incluyen la liberación intraarterial y / o intracoronaria, por ejemplo inyección en la arteria coronaria (véase, por ejemplo, el documento WO 99/29251) y la administración endovascular (véase, por ejemplo, las patentes US nº 6.001.350; 6.066.123; y 6.048.332; y las publicaciones PCT WO 99 / 31982, WO 99/33500 y WO 00/15285). Así, por ejemplo, se puede inyectar una composición como se describe aquí directamente en el miocardio.

- 65 Opciones adicionales para la liberación de composiciones para modular la expresión génica de PLN incluyen la administración sistémica mediante la administración intravenosa o subcutánea, acceso a la cámara cardíaca (véase,

por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.924.424) y la ingeniería de tejidos (la patente de EE.UU. 5.944.754).

Otros métodos de administración conocidos por los expertos en la técnica incluyen los métodos descritos en las patentes de EE.UU. N° 5.698.531; 5.893.839; 5.797.870; 5.693.622; 5.674.722; 5.328.470; y 5.707.969.

X. APLICACIONES

A. GENERAL

Las ZFP diseñadas para unirse a un sitio de destino elegido en un gen de interés, y los ácidos nucleicos que los codifican, se puede utilizar para modular la expresión PLN en cualquier materia y, al hacerlo, trastornos relacionados con la contractilidad-tratar tales como la insuficiencia cardíaca congestiva. Generalmente, un sitio diana de un ácido nucleico dentro de una célula o población de células se pone en contacto con una ZFP que ha especificidad de unión para ese sitio de destino. Los métodos pueden realizarse in vitro con cultivos celulares o in vivo. Ciertos métodos se llevan a cabo de tal manera que la insuficiencia cardíaca congestiva es tratada por la represión de la expresión génica PLN.

B. ANIMALES TRANSGÉNICOS / DEFECTIVOS

Utilizando las composiciones y métodos descritos en el presente documento, los animales transgénicos pueden generarse usando técnicas estándar. Además, también se pueden generar defectivos en PLN o inactivados. Por ejemplo, una ZFP específica de PLN tal como se describe en el presente documento que reprime la expresión de PLN se administra a cualquier animal con el fin de crear un animal defectivo o inactivado. Estos animales son útiles como modelos para la enfermedad y para la prueba de fármacos. Actualmente, sólo se dispone de ratones defectivos en PLN. Por lo tanto, los represores de ZFP como se describen en el presente documento hacen posible reducir o eliminar la actividad PLN en cualquier modelo animal, para los que actualmente no existen maneras posibles de generar defectivos.

Además, como muchos modelos animales aceptados para el estudio de enfermedades del corazón y la evaluación de los fármacos candidatos son modelos que no son ratones, la capacidad de crear defectivo en PLN /inactivos en cualquier animal utilizando las ZFP dirigidas a PLN descritas en el presente documento representa un importante avance en el campo.

C. APLICACIONES TERAPÉUTICAS

Las ZFP proporcionadas en el presente documento y los ácidos nucleicos que los codifican, como en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden utilizar para modular (por ejemplo, activar o reprimir) la expresión de PLN, modulando de esta manera la contractilidad cardíaca. La modulación de la contractilidad cardíaca puede dar como resultado la mejora o eliminación de varias condiciones cardíacas. Por ejemplo, PLN puede ser reprimido utilizando ZFP dirigida PLN-tanto en cultivos celulares (aplicaciones es decir, in vitro) e in vivo para mejorar la contractilidad cardíaca. Debido a represores de ZFP para PLN no cambian significativamente los niveles de expresión de los otros genes (ver, los ejemplos), es probable que ser más específico que los métodos antisentido. A diferencia del enfoque antisentido, que necesita para llegar a un gran número de copias de ARNm PLN, sólo hay dos sitios de unión en cada celda para ser dirigidos por una ZFP (es decir, las dos copias del gen diana), por lo tanto, una ZFP puede funcionar a un nivel de expresión relativamente baja.

Por lo tanto, ciertos métodos para el tratamiento de enfermedades del corazón implican la introducción de una ZFP específica PLN-en un animal. La unión de la ZFP que lleva un dominio de represión a los resultados de PLN en aumento de la contractilidad cardíaca y mejora (o eliminación) de la insuficiencia cardíaca congestiva. Un dominio de represión fusionado a la ZFP reprime la expresión de PLN.

Una variedad de ensayos para evaluar la expresión PLN que se refiere a la contractilidad cardíaca son conocidos. Por ejemplo, los ecocardiogramas y otras técnicas de imagen en tiempo real se pueden utilizar in vivo. Véase, por ejemplo, Santana et al. Buques (1997) Corazón Supl 12: 44-9. La capacidad de las ZFPs-dirigidos PLN y / o ácidos nucleicos que codifican estas ZFP para modular la contractilidad cardíaca se puede evaluar, por ejemplo, en ensayos transitorios de calcio como se describe en los ejemplos, así como Fujii et al. (1990) FEBS Lett. 273 (1-2): 232-4; Nakayama et al. (2002) FASEB J 17 (1): 61-3; Zhao et al. (2003) Cardiovasc Res. 57 (1): 71-81. Otra opción es medir (2+) la absorción de oxalato-facilitado Ca dependiente de ATP de homogeneizados de miocitos, como se discute en Chossat et al. (2001) Cardiovasc Res. 49 (2): 288-97. Ensayos de ejemplares adicionales para la contractilidad incluyen la evaluación hemodinámica de la función ventricular como máximo dP / dt al inicio o en respuesta al aumento de dosis de dobutamina-β agonista; medición de la fracción de acortamiento (FS) por ecocardiografía; y la medición de los transitorios de calcio en los cardiomiocitos usando colorantes sensibles al calcio como fluo-3-AM. Véase, por ejemplo, Minamisawa et al. (1999) Cell 99 (3): 313-322 y Braz et al. (2004) Nature Med. 10 (3): 248-254. Otros ensayos se describen en la Patente de Estados Unidos. No. 6.569.862. Además, el examen microscópico de secciones de tejido se puede realizar, así como imágenes de vídeo de células aisladas

sometidos a estimulación eléctrica para medir las propiedades contráctiles. Estos y otros métodos se aceptan los ensayos y los resultados también se pueden extrapolar a otros sistemas.

Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente para ilustrar con mayor detalle aspectos particulares de los métodos y composiciones descritas y no deben ser interpretados como limitantes en modo alguno.

EJEMPLO 1: MATERIALES Y MÉTODOS

A. CULTIVO CELULAR Y TRANSFECCIÓN

Células H9c2 (2-1) de rata se cultivaron en DMEM con 10% FBS. Las células se sembraron en placas de 6 pocillos a la densidad de $\sim 1,5 \times 10^5$ células / pocillo 16 a 24 horas antes de la transfección. Se realizaron transfecciones duplicadas para cada construcción utilizando reactivos de transfección FuGENE 6 (Roche, Indianapolis, IN). 1-1,2 μg del plásmido de expresión ZFP-TF o del plásmico control se transfectaron en cada pocillo utilizando 6 μl de reactivo Eugene 6. Los medios que contienen reactivos de transfección se retiró después de 8 horas y se añadió medio fresco. Las células se recogieron 48 a 72 horas después de la transfección para el aislamiento de ARN.

Células SJRH30 humanas se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10%) de FBS. Las células fueron sembradas en placas de 6 pocillos a una densidad de $\sim 2 \times 10^5$ células / pocillo de 16 a 24 horas antes de la transfección. Se realizaron transfecciones duplicadas para cada construcción utilizando reactivos de transfección Eugene 6 (Roche, Indianapolis, IN). Para cada pocillo, 1,2 μg de plásmidos represoras de ZFP se mezclaron con 6 μl de reactivos de transfección Eugene 6 durante 30 minutos. El complejo se añadió en el cultivo con medio libre de suero. Los medios que contienen reactivos de transfección se retiró después de 8 horas y se añadió medio fresco. Las células se recogieron 48 a 72 horas después de la transfección.

Células UtSMC humanas se cultivaron con medio Bulletkit SmGM-2 (Cambrex, Rockland, ME). La nucleofección se llevó a cabo según el protocolo de fabricación (Amara Biosystems, Colonia, Alemania). En resumen, 5×10^5 células y 5 μg de plásmido de ADN se mezclaron con 100 μl de Solución Nucleofector V. Después de la electroporación con el programa Nucleofector T-30, las células se sembraron en placas de 6 pocillos. Las células se recogieron 48 a 72 horas después de la transfección.

Se aislaron cardiomiocitos primarios de ratones de 1 día de edad (cepa: Sprague Dawley), y se infectaron con adenovirus que expresan bien ZFP 6439-Kox o el dominio Kox solo.

B. SELECCIÓN CON FÁRMACOS PARA ENRIQUECER LAS CÉLULAS POSITIVAS PARA EL TRANSGEN

Para enriquecer la población de células transfectadas, se realizó un protocolo de selección de medicamentos para matar las células sin transfectar. 1,2 μg del plásmido de expresión ZFP-TF o control fueron co-transfectadas con 0,3 μg de vector de resistencia a puromicina. A las 24 horas después de la transfección, se añadió puromicina a los medios (en una final concentración de 1,5 μg / ml para las células (2-1) H9c2, y 1,0 μg / ml para células SJRH30). Después de 60 horas de la selección de puromicina, la mayoría de las células sin transfectar murieron. Las células resistentes se recogieron para el análisis de ARN posterior.

C. ANÁLISIS TAQMAN

El ARN se aisló usando el Kit de Aislamiento de ARN High Pure (Roche) o el Kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA). Ensayos TaqMan se realizaron como se ha descrito previamente (J. Biol Chem 275: 33850). En resumen, TaqMan se realizó en formato de placa de 96 pocillos en ABI 7700 SDS máquina (Perkin Elmer, Boston, MA) y se analizaron con el software SDS versión 1.6.3. Las muestras de ARN (25 ng) se mezclaron con 0,1 M de sonda y cantidad óptima de cada cebador, 5,5 mM de MgCl_2 y 0,3 mM (cada uno) dNTP, 0,625 unidad de AmpliTaq Gold ADN Polimerasa, 6,25 unidades de transcriptasa inversa MultiScribe, y 5 unidades de inhibidor de RNasa en tampón IX TaqMan A partir de PE. Las reacciones de transcripción inversa se realizaron a 48 ° C durante 30 minutos. Después de desnaturalización a 95 ° C durante 10 minutos, se llevaron a cabo reacciones de amplificación de PCR para 40 ciclos a 95 ° C durante 15 segundos y a 60 ° C durante 1 minuto. Los niveles de PLN y GAPDH ARNm se cuantificaron utilizando curvas estándar que abarcan una gama de 125 veces la concentración (niveles relativos de 0,2 a 25; serie de dilución de cinco veces). Cada muestra de ARN se sometió a ensayo en las reacciones Taqman duplicados. La relación de PLN / GAPDH se utilizó para determinar los niveles relativos de PLN en diversas muestras. Secuencias y concentraciones de cebadores y sondas se proporcionan en la Tabla A.

TABLA A
REACTIVOS TAQMAN

Sec id DEL GEN DIANA	Nombre del oligonucleótido	Secuencia (5' --> 3')	µM/rxn
PLN de rata	rPLN-57F	AGTCTGCATTGTGACGATCACAG	0,3
50	rPLN-125R	GCAGGCAGCCAAACGC	0,9
51	rPLN-81T**	AGCCAAGGCCTCCTAAAAGGAGACAGCT	0,1
52			
GAPDH de rata	mGAPDH-F1	CCCATGTTTGTGATGGGTGTG	0,1
53	mGAPDH-R1	CATGGACTGTGGTCATGA	0,3
54	mGAPDH-P1**	ATCCTGCACCACCAACTGCTTAGC	0,1
55			
human PLN	hPLN-F56	TCTATACTGTGATGATCACAGCT	0,3
56	hPLN-R173	CAGGACAGGAAGTCTGAAGT	0,3
57	hPLN-PF119L**	CTGCCAGCTTTTTATCTTTCTCTCGACC	0,1
58			
GAPDH humano	hGAPDH-Fol	CCATGTTTCGTCATGGGTGTGA	0,1
59	hGAPDH-Re1	CATGGACTGTGGTCATGAGT	0,1
60	hGAPDH-Pr1**	TCCTGCACCACCAACTGCTTAGCA	0,1
61			
kox	koxFor2	GGTTGGAGAAGGGAGAAGAG	0,1
62	FLAG-Rev	TACTTGTTCATCGTCGTCCTTGT	0,1
63	Kox-Pro2**	CACCAAGAGACCCATCCTGATTGAG	0,1
64			
18S de rata	18S-ForI	TTCCGATAACGAACGAGACTCT	0,1
65	18S-RevI	TGGCTGAACGCCACTTGTC	0,1
66	18S-Pro1**	TAAC TAGTTACGCGACCCCCGAG	0,1
67			

Nota: Los asteriscos (**) denotan sondas. Los extremos de las sondas están marcados con: 5' -- 6FAM; y 3' -- BHQ1 ("Inactivador Black Hole 1" ® - Biosearch).

D. ARN DE CARDIOMIOCITOS PRIMARIOS DE RATA: AISLAMIENTO E INFECCIÓN

- 5 Ratas Sprague Dawley de 51 días de edad fueron sacrificadas y sus corazones diseccionaron para la digestión enzimática (115 unidades / ml de colagenasa (Worthington) y 0,8 mg / ml Pancreatina (Sigma) en tampón de anuncios). La digestión se realizó con 15 ml de solución de enzima, en un matraz de agitación con 37 ° C baño de agua circulante. Después de 30 minutos de la digestión, piezas de corazón se dejaron sedimentar brevemente y la solución de enzima (que contiene principalmente glóbulos rojos y residuos de células) fueron retirados y desechados. Solución de enzima fresco se añadió a piezas de corazón. Cada 20 minutos, se recogieron células disociadas, y solución de enzima fresco se añadió a las piezas de corazón restantes. Este proceso se repitió 4 veces, y las células recogidas se agruparon. Las células fueron entonces en capas sobre la parte superior de un gradiente de Percoll. Cada gradiente de Percoll consistía en 4 ml de Percoll superior (densidad de 1,059 mg / ml) y 3 ml de Percoll inferior (densidad de 1,082 mg / ml); células de -10 corazones se cargaron en cada gradiente. Después de 30 minutos de centrifugación a 3000 rpm, se recogieron, se lavaron y se sembraron en placas de cultivo que se pretrataron con 1% de gelatina (Sigma) cardiomiocitos en la interfase entre el Percoll parte superior e inferior. El medio de siembra fue una mezcla de DMEM (68%, Invitrogen), MI 99 (17%, Invitrogene), suero de ternera fetal (5%, Hyclone) y suero de caballo (10%, Hyclone). Dos días después de la siembra, los medios de chapado se reemplazó con medio de crecimiento, que consistía en 80% de DMEM y 20% MI 99.

- 20 Para la infección por adenovirus, los cardiomiocitos de rata neonatal se sembraron a 60.000 células / pocillo en una placa de cultivo celular de 24 pocillos. Dos días más tarde, aproximadamente la mitad de las células sembradas se estima que se adjunta en el plato. Estas células fueron infectadas con adenovirus recombinante a una multiplicidad de infección (MOI) de 100, 200 y 400 durante 24 h a 37. A las 48 horas de la infección, se recogieron las células para los análisis de ARN.

E. PRODUCCIÓN DE ADENOVIRUS E INFECCIÓN

Los vectores adenovirales recombinantes, Ad-Koxl y Ad-6439Koxl, fueron creados como sigue: el fragmento Mlu I-Afl II del plásmido pcDNA4 / A (Invitrogen), que consiste en el citomegalovirus humano inmediato principios de promotor / potenciador (CMV) y dos secuencias de operador de tetraciclina (TetO₂), y el fragmento Afl II-Xho I del plásmido pcDNA3-Koxl o pcDNA3-6439Koxl que contiene el casete de expresión ZFP, se clonaron de forma simultánea en los sitios de restricción Mlu I y Xba I aguas arriba de una señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH poliA) en el plásmido pShuttle (Clontech). El casete de CMV-TetO₂-ZFP-BGH poliA se escindió entonces a través de los sitios de restricción I-Ceu I y PI-Sce I únicos en el pShuttle y se ligó al ADN viral adeno-X previamente digerido con I-Ceu I y PL- Sce I (Clontech). Todas las secuencias clonadas fueron verificadas por secuenciación del ADN.

Los vectores adenovirales recombinantes se empaquetaron mediante la transfección de T-REX[™] -293 células (Invitrogen) y adenovirus fueron cosechadas a partir de células transfectadas T-REX[™] -293 lisadas con tres ciclos de congelación-descongelación consecutivas. Los adenovirus recombinantes se amplificaron aún más en T-REX[™] -293 células y se purificaron por doble centrifugación en gradiente de cloruro de cesio (Qiagen). Adenovirus recombinantes purificadas se dializaron frente a tres cambios de 10 mM Tris pH 8,0-2 mM MgCl₂-4% de sacarosa, y se almacenan en alícuotas a -80 °C. Número de partículas adenovirales se determinaron por absorbancia a 260 nm y títulos infecciosos se determinaron utilizando el X adeno-Titer Kit Rápido (Clontech).

EJEMPLO 2: REPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN FOSFOLAMBAN EN LÍNEAS CELULARES UTILIZANDO PROTEÍNAS DE DEDOS DE CINCO DISEÑADAS

Las proteínas de fusión que comprenden proteínas con dedos de cinc de 6 dedos diseñados para reconocer un sitio diana en PLN y un dominio de represión fueron diseñados como se describe anteriormente en y en la Patente de Estados Unidos N° 6.607.882. Las ZFP diseñados y los sitios diana reconocidos por estos ZFP se muestran en las Tablas 2-4.

A. PROTEÍNAS DE FUSIÓN QUE COMPRENDEN ZFP DE RATA DIRIGIDAS A PLN

Con el fin de probar la capacidad de ZFP diseñados como anteriormente y mostrados en las Tablas 2-4, se llevaron a cabo los siguientes experimentos. Las secuencias que codifican una proteína de fusión que comprende un PLN orientada ZFP (SBS-6439, SBS-6435 o SBS-6437) y un dominio de represión (KOX) se introdujeron en un esqueleto del plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA) para crear PLN plásmidos de expresión ZFP -targeted. Vectores de plásmido pcDNA3.1 vacío también se prepararon para su uso como controles. Vectores AAV-ZFP específica PLN-También se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Las proteínas de fusión fueron designados 6439-KOX, 6437-KOX y 6435-KOX.

Los plásmidos o vectores basados en AAV, incluyendo uno de 6439-KOX, 6437-KOX o 6435-KOX se transfectaron en cultivadas de rata H9c2 (2-1) las células como se describe en el Ejemplo 1. Los vectores vacíos fueron utilizados como controles. Para los ensayos de selección de fármacos, un plásmido resistente a la puromicina se co-transfectadas con el plásmido que contiene PLN-ZFP o el vector de control para enriquecer la población transfectada. Las células se seleccionaron con 1 mg / ml de puromicina para matar las células sin transfectar. Expresión ZFP se midió mediante el ensayo de Taqman como se describe en el Ejemplo 1.

La FIG. 2 A muestra los resultados de la represión de la expresión de rata usando PLN-KOX 6439, 6437 o 6435-KOX-KOX en vectores plasmídicos. FIG. 2B muestra la represión PLN en celdas seleccionadas no seleccionados y puromicina transfectadas con 6439-KOX en un vector plásmido. En las células no seleccionadas, 6439-KOX reprime la expresión PLN en aproximadamente un 75% o en comparación con las células transfectadas por vectores vacíos. En las células puromicina seleccionado, 6439-KOX reprime la expresión de rata PLN en aproximadamente un 97% en comparación con las células transfectadas vector vacío. FIG. 2C muestra la represión PLN por 6439-KOX cuando se administra utilizando cualquiera de los plásmidos (pcDNA) o vectores AAV. AAV entrega de 6439-KOX reprimida expresión rata PLN en aproximadamente un 98%. (Fig. 2C). Además, el aumento de la represión PLN se correlaciona con un mayor nivel de expresión de ZFP a partir del vector AAV-MCS (Stratagene, La Jolla, CA) en comparación con el vector pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

B. PROTEÍNAS DE FUSIÓN QUE COMPRENDEN ZFP DIRIGIDAS A PLN HUMANO

La represión de la expresión génica PLN humano también se ensayó usando proteínas de fusión que comprenden ZFP dirigidos a PLN humana (SBS-6576 y SBS-6624) y un dominio de represión KOX. Fusiones ZFP-Kox se designaron 6576-KOX y 6624-KOX.

Las células SJRH30 se cultivaron y se sometieron a selección con puromicina como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. La selección de puromicina resultó en más de un 85% de eficiencia de transfección, tal como se mide mediante la determinación de células positivas al transgén.

Células UtSMC se cultivaron como se describe en el Ejemplo 1. Las células fueron sometidas al protocolo de nucleofección, esencialmente como se describe en las instrucciones del fabricante (Amaya, Alemania).

Como se muestra en la figura. 3, 6576-KOX y 6624-KOX reprimidos PLN humano en aproximadamente un 75% en SJRH30 células. (Fig. 3B y 3D). En las células UtSMC, 6576-KOX reprimida la expresión PLN en aproximadamente un 75% mientras 6624 KOX reprimida la expresión PLN humano en aproximadamente un 60%. (Fig. 3A y la Fig. 3C).

Por lo tanto, las ZFP dirigidas PLN son capaces de reprimir la expresión de PLN.

EJEMPLO 3: REPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN DE FOSFOLAMBAN EN CARDIOMIOCITOS USANDO PROTEÍNAS DEDO DE CINCO DISEÑADAS

A. CARDIOMIOCITOS DE RATA ADULTA

La proteína de fusión 6439-KOX también se ensayó para determinar su capacidad para modular Ca^{2+} transitorio en los miocitos de rata adulta. En pocas palabras, plásmidos que codifican 6439-KOX se co-inyectaron en el miocardio de rata adulta con un plásmido que codifica la GFP verde fluorescente.

Los cardiomiocitos se aislaron 3 días después de la inyección, y se incubaron con colorante fluo-3-AM sensible a Ca^{2+} . Los cambios en la fluorescencia se controlaron con un microfluorímetro. Véase Minamisawa et al., ant.

Como se muestra en la figura. 4, 6439-KOX aumenta los tránsitos de Ca^{2+} en cardiomiocitos de ratas adultas. En comparación con las células sin transfectar, 6439-KOX que contiene células mostradas Ca^{2+} transitorios con una duración más corta y el deterioro más rápido, lo que indica que ZFP mediada por la represión de PLN es suficiente para cambiar el Ca^{2+} . Análisis de imágenes de vídeo también mostró que los cardiomiocitos aislados contracción transfectadas con un plásmido que codifica 6439-KOX transfectadas-había acelerado tasas de acortamiento y la relajación en comparación con células sin transfectar.

B. CARDIOMIOCITOS PRIMARIOS

Para probar la actividad de 6439-KOX, se realizaron los siguientes experimentos. Cardiomiocitos primarios fueron aisladas de 1 día de edad ratas neonatales. El nivel de expresión de PLN en estas células eran ~50 veces mayor que la de H9c2 (2-1) las células (Fig. 5A).

El 6439-KOX se administró a los cardiomiocitos primarios que utilizan vectores plasmídicos o de AAV como se ha descrito anteriormente. Hemos observado que la eficacia de transfección en células cardiomiocitos es típicamente muy baja (<10%) usando vectores plásmidos; en consecuencia, ZFP fueron entregados usando adenovirus, que puede infectar > 85% de las células.

El 6439-KOX reprimió la expresión PLN en un dependiente de la dosis manera en cardiomiocitos primarios de rata (Fig. 5B), indicando que ZFP orientada PLN bloquean eficazmente la transcripción de PLN.

EJEMPLO 4: ESPECIFICIDAD

Para probar la especificidad de ZFPs-dirigidos PLN, se realizaron los siguientes experimentos de micromatrices.

A. PROTEÍNAS DE FUSIÓN QUE COMPRENDEN SBS-6573 (HUMANAS)

Para probar la especificidad de 6573-KOX, el ARN total a partir de células UtSMC fue aislado utilizando RNeasy mini kit (QIAGEN) de acuerdo con el fabricante recomendaciones. Muestras de ARN para la hibridación se prepararon según el protocolo de marcaje de muestras pequeñas Affymetrix GeneChip usando 200 ng de ARN total. Los cambios en la expresión génica se analizaron utilizando Affymetrix humana matriz U-133A, que contiene 22.283 sondas que representan aproximadamente 16.000 genes. Affymetrix Microarray Suite 5.0 y el software de herramientas de minería de datos 3.0 se utilizaron para el análisis de datos. Los criterios para los genes expresados diferencialmente fueron: cambio > 2 veces, 100% de llamadas confianza y valor de p < 0,05.

B. PROTEÍNAS DE FUSIÓN QUE COMPRENDEN SBS-6439 (RATA)

Para 6439-KOX, se sembraron células H9C2(2-1) en placas de Ploo (~ 1×10^6 células / placa). 7 g de 6439-Kox o pcDNA3 vector vacío se transfectaron en cada placa con 30 μ l de reactivo Lipofectamina 2000. La transfección medios que contiene reactivo se retiró después de 8 horas y se añadió medio fresco. Las células se recogieron 60 horas después de la transfección.

El ARN total se aisló usando reactivo TRIzol (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. Muestras de

ARN para la hibridación se prepararon de acuerdo con el protocolo estándar de Affymetrix usando 10 g de ARN total. Los cambios en la expresión génica se analizaron mediante rata RAE-230A matriz, que contiene 15.923 sondas que representan aproximadamente 14.000 genes. El análisis de datos se realizó utilizando Affymetrix Microarray Suite 5.0 y el software de herramientas de minería de datos 3.0. Criterios de genes expresados diferencialmente fueron: cambio > 2 veces, 100% de llamadas confianza y valor de $p < 0,05$.

C. RESULTADOS

Aproximadamente 14.000 y 16.000 se monitorizaron mediante micromatrices de rata y humanas descritas anteriormente. En tanto rata y células humanas probado, PLN era el único gen cuyo cambio en el nivel de expresión cumplen los siguientes criterios: 1) a 2 veces o más la represión como se ensayó por análisis de Affymetrix, 2) una llamada de confianza 100% hecho por análisis de Affymetrix, 3) un valor de $p < 0,05\%$ y 4) una represión 2 veces o más cuando el nivel de ARN se confirmó usando ensayos TaqMan.

ZFP por lo tanto, PLN-dirigidos descritos en el presente documento presentan especificidad para genes PLN.

EJEMPLO 5: USO DE VECTORES DE VIRUS ADENOASOCIADO (AAV) PARA LA LIBERACIÓN DE FACTORES RE TRANSCRIPCIÓN MODIFICADOS DE REGULACIÓN DE FOSFOLAMBAN EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE ÚTERO CULTIVADAS

Las secuencias que codifican la proteína dedo de cinc de tres dedos SBS-1563 (ver Tablas 1 y 3) fusionado a un dominio de represión KOX (1563-KOX) fueron clonados en un vector pAAV- MCS (Stiategene, La Jolla, CA). Esta construcción se co-transfectó en células HEK 293 junto con pAAV-RC y los plásmidos pHelper (ambos de Stiategene, La Jolla, CA). Tres días más tarde, la obtención y uso como fuente de virus ZFP-codificación lisados brutos.

Células UtSMC, una línea de células de músculo liso uterino primarias humanas, fueron infectadas con el lisado AAV crudo a una MOI de 2×10^4 genomas de vectores por célula. A las 72 horas post-infección, se recogieron las células, su ARN se extrajo y la cantidad de ARNm de fosfolamban se midió por PCR en tiempo real (Taqman®). Los resultados, mostrados en la Figura 6, indican una reducción de aproximadamente dos veces en el ARNm de fosfolamban después de la infección con AAV que codifica el represor fosfolamban 1563-KOX.

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico, donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que reprime la transcripción de un gen de fosfolamban, donde el polipéptido comprende:

- (i) un dominio de unión a ADN de dedo de cinc que está diseñado para unirse a un sitio diana en el gen fosfolamban; y
 - (ii) un dominio de represión de la transcripción;
- donde el ácido nucleico puede expresarse en una o más células de un sujeto a tratar,
- donde el dominio de unión a ADN de dedo de cinc comprende seis dedos de cinc y la secuencia de aminoácidos de las regiones de reconocimiento de los dedos de cinc se selecciona del grupo que consiste en:

- (i)
- F1: RSDHLSQ (SEC ID N° 38)
- F2: RSDVRKN (SEC ID N° 39)
- F3: RSDALSV (SEC ID N° 40)
- F4: DNANRTK (SEC ID N° 41)
- F5: RSDHLST (SEC ID N° 42)
- F6: TSSNRTK (SEC ID N° 43), y
- (ii)
- F1: RSDNLSE (SEC ID N° 44)
- F2: HRSRKT (SEC ID N° 45)
- F3: DSESLNA (SEC ID N° 46)
- F4: TSSNLSR (SEC ID N° 47)
- F5: RSDNLSQ (SEC ID N° 48)
- F6: QRQHRKT (SEC ID N° 49).

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para su uso en la modulación de la contractilidad cardiaca en un sujeto.

3. Un polinucleótido que codifica una proteína que comprende un dominio de dedos de cinc modificado de unión al ADN, donde el dominio de unión a ADN comprende seis dedos de cinc y la secuencia de aminoácidos de las regiones de reconocimiento de los dedos de cinc es la siguiente:

- F1: RSDHLSQ (SEC ID N° 38)
- F2: RSDVRKN (SEC ID N° 39)
- F3: RSDALSV (SEC ID N° 40)
- F4: DNANRTK (SEC ID N° 41)
- F5: RSDHLST (SEC ID N° 42)
- F6: TSSNRTK (SEC ID N° 43).

4. Un polinucleótido que codifica una proteína que comprende un dominio de dedos de cinc modificado de unión al ADN, donde el dominio de unión a ADN comprende seis dedos de cinc y la secuencia de aminoácidos de las regiones de reconocimiento de los dedos de cinc es la siguiente:

- F1: RSDNLSE (SEC ID N° 44)
- F2: HRSRKT (SEC ID N° 45)
- F3: DSESLNA (SEC ID N° 46)
- F4: TSSNLSR (SEC ID N° 47)
- F5: RSDNLSQ (SEC ID N° 48)
- F6: QRQHRKT (SEC ID N° 49).

5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el dominio de represión transcripcional es un dominio KOX.

6. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido, donde el polipéptido comprende:

- (i) un dominio de unión a ADN de dedo de cinc que está diseñado para unirse a un sitio diana en el gen fosfolamban; y
 - (ii) un dominio de represión de la transcripción;
- mediante el cual el polipéptido es capaz de unirse al sitio diana y reprimir la transcripción del gen fosfolamban, donde el dominio de dedos de cinc de unión al ADN comprende seis dedos de cinc y la secuencia de aminoácidos de las regiones de reconocimiento de los dedos de cinc se selecciona del grupo que consiste en:

(i)

F1: RSDHLSQ (SEC ID N° 38)
F2: RSDVRKN (SEC ID N° 39)
F3: RSDALSV (SEC ID N° 40)
F4: DNANRTK (SEC ID N° 41)
F5: RSDHLST (SEC ID N° 42)
F6: TSSNRTK (SEC ID N° 43), y

(ii)

F1: RSDNLSE (SEC ID N° 44)
F2: HSRSRKT (SEC ID N° 45)
F3: DSESLNA (SEC ID N° 46)
F4: TSSNLSR (SEC ID N° 47)
F5: RSDNLSQ (SEC ID N° 48)
F6: QRQHRKT (SEC ID N° 49).

7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en la modulación de la contractilidad cardíaca en un sujeto.

8. Una proteína que comprende un dominio de dedos de cinc modificado de unión al ADN, donde el dominio de unión a ADN comprende seis dedos de cinc y la secuencia de aminoácidos de las regiones de reconocimiento de los dedos de cinc es la siguiente:

F1: RSDHLSQ (SEC ID N° 38)
F2: RSDVRKN (SEC ID N° 39)
F3: RSDALSV (SEC ID N° 40)
F4: DNANRTK (SEC ID N° 41)
F5: RSDHLST (SEC ID N° 42)
F6: TSSNRTK (SEC ID N° 43).

9. Una proteína que comprende un dominio de dedos de cinc modificado de unión al ADN, donde el dominio de unión a ADN comprende seis dedos de cinc y la secuencia de aminoácidos de las regiones de reconocimiento de los dedos de cinc es la siguiente:

F1: RSDNLSE (SEC ID N° 44)
F2: HSRSRKT (SEC ID N° 45)
F3: DSESLNA (SEC ID N° 46)
F4: TSSNLSR (SEC ID N° 47)
F5: RSDNLSQ (SEC ID N° 48)
F6: QRQHRKT (SEC ID N° 49).

10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, donde el dominio de represión transcripcional es un dominio KOX.

FIG. 1

A. Proteína de fusión que comprende SBS-6439 (SEC ID Nº 68)

MAPKKKRVGIHGVPAAAMAERPYPVESCDRRFSTSADLTEHIRIHTGQKPFQCRI
CMRNFSASANLSRHIRTHTGGERPFQCRICMRNFSRSDALSTHIRTHTGEKPFACDI
CGRKFADRSTRTKHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSRSDVLSAHIRTHTGEKPFACDI
CGKKFADRSNRIKHTKIHLRQKDAARGSGMDAKSLTAWSR TLVTFKDV FVDFTREEW
KLLDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETHP
DSETAFEIKSSVDYKDDDDK

B. Proteína de fusión que comprende SBS-6576 (SEC ID Nº 69)

MAPKKKRVGIHGVPAAAMAERPQCRICMRNFSRSDHLSQHIRTHTGEKPFACDICG
KKFARSDVRKNHTKIHTGGGGSQRPQCRICMRNFSRSDALSVHIRTHTGEKPFACD
ICGRKFADNANRTKHTKIHTGSQKPFQCRICMRNFSRSDHLSHIRTHTGEKPFACD
ICGRKFATSSNRTKHTKIHLRQKDAARGSGMDAKSLTAWSR TLVTFKDV FVDFTREE
WKLDDTAQQIVYRNVMLENYKNLVSLGYQLTKPDVILRLEKGEEPWLVEREIHQETH
PDSETAFEIKSSVDYKDDDDK

FIG. 2A

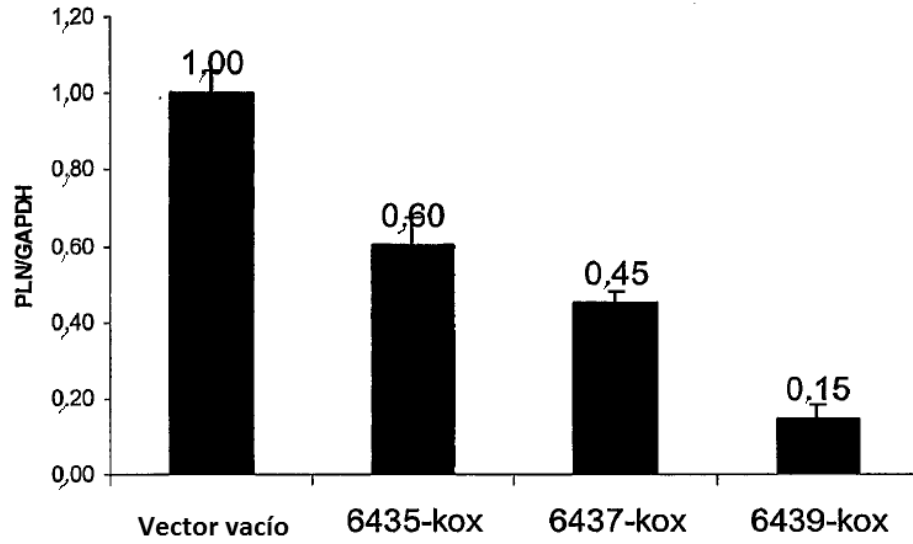
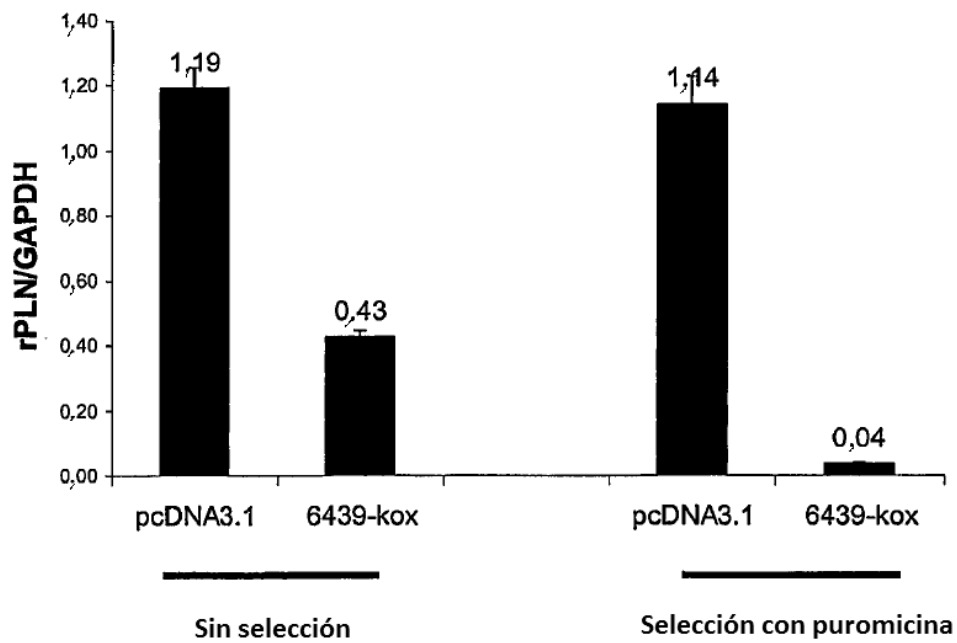


FIG. 2B



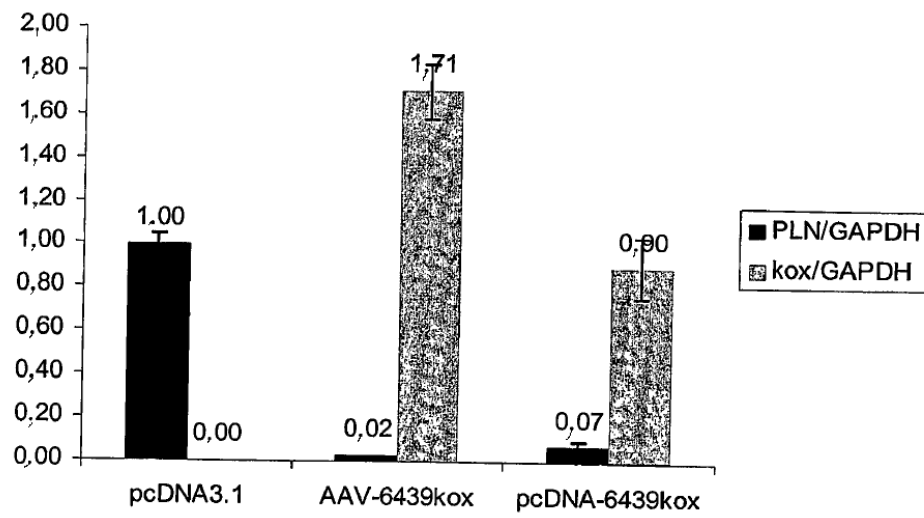


FIG. 2C

FIG. 3

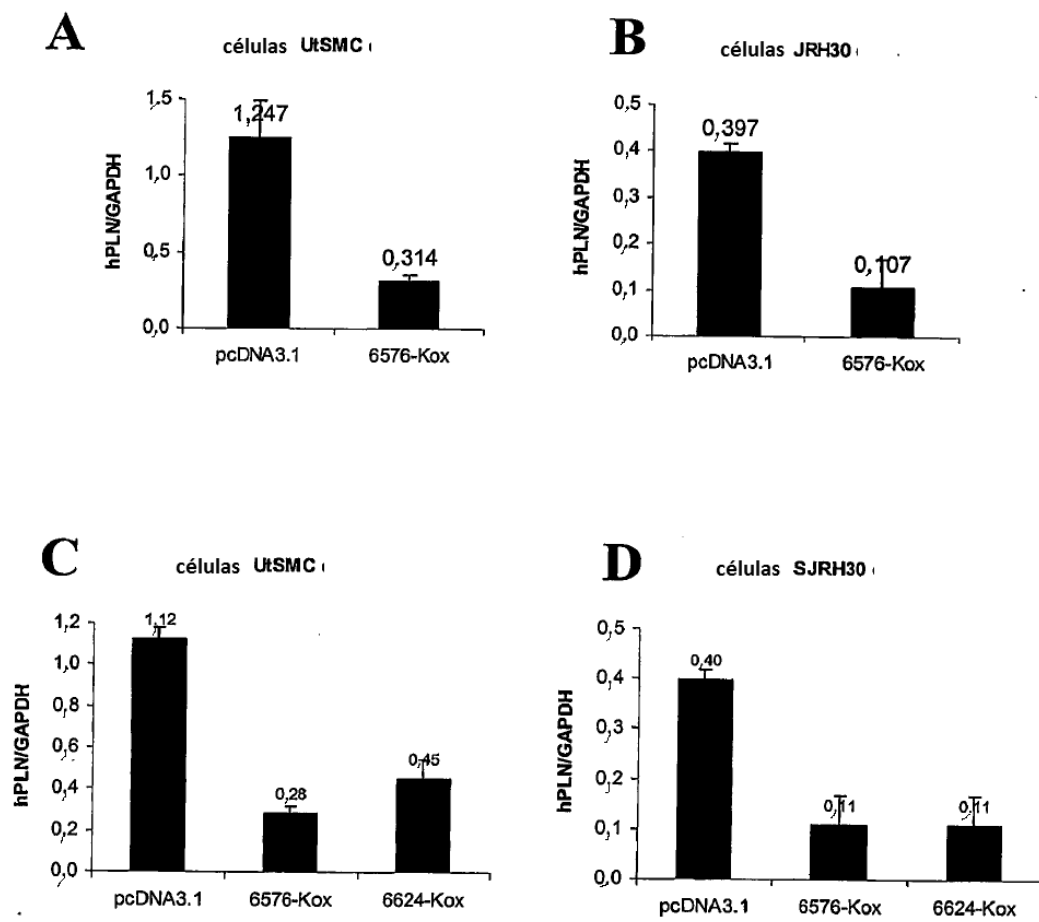


FIG. 4

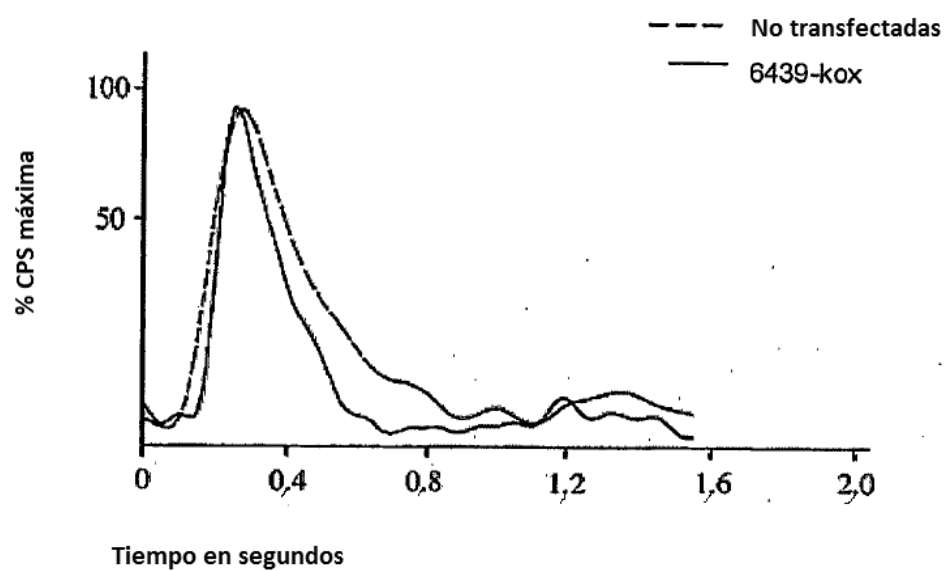


FIG. 5A

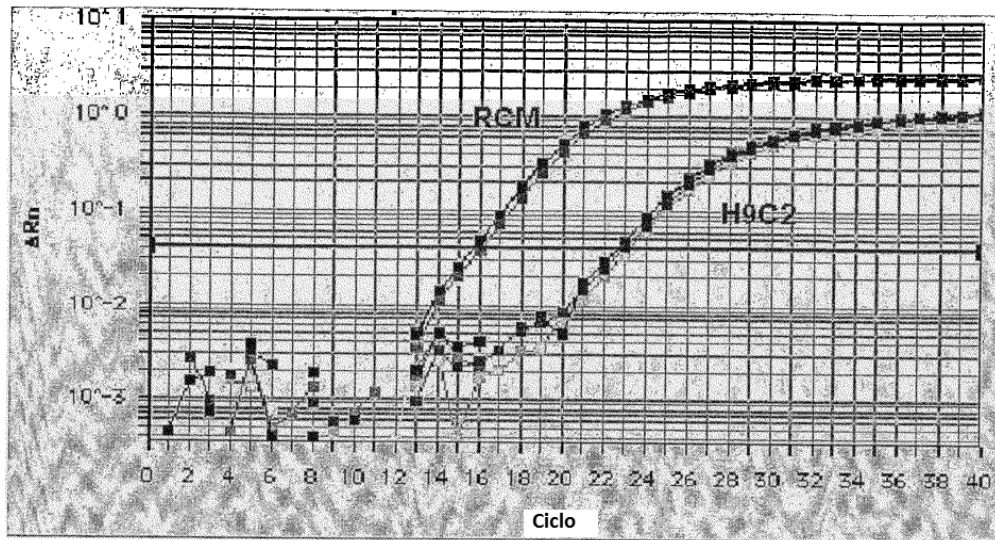


FIG. 5B

